

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Validación de una técnica de análisis por
cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para
cuantificar norfloxacin y fenazopiridina clorhidrato
en cápsulas orales**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico(o)

AUTORES

Giovanna Francisca Mayorga Bustinza

Cesar Benjamin Del Castillo Herrera

ASESOR

Bell Cortez, Carlos Alejandro

Lima – Perú

2010

*A mis papás y a mis queridas
hermanas por su confianza y gran
apoyo.*

Giovanna.

*A mis padres y hermana por su
apoyo y comprensión, a Edwin y
Gladys por su paciencia; a Onelia y
Manuel que me cuidan siempre.*

César.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

A los Miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Q.F. Whu Whu, Delia	(PRESIDENTE)
---------------------	--------------

Mg. Carlos Casas, Norma	(Miembro)
-------------------------	-----------

Q.F. Pérez León Camborda, Juan	(Miembro)
--------------------------------	-----------

Q.F. Ramírez Cruz, Francisco Javier	(Miembro)
-------------------------------------	-----------

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos** por la formación profesional recibida.

Al **Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez**, asesor de esta tesis, nuestro profundo agradecimiento por sus valiosos aportes y tiempo brindado.

A **los profesores de la Facultad**, que con sus conocimientos brindados, nos forjaron y fortalecieron en nuestro desarrollo profesional.

A **Corporación INFARMASA S.A.** por permitirnos desarrollar nuestro trabajo en sus instalaciones y en especial al área de Control de Calidad por su gran calidad humana y disposición.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	Introducción	9
II.	Objetivos	11
III.	Antecedentes	12
IV.	Generalidades	14
V.	Parte experimental	34
VI.	Resultados	105
VII.	Discusiones	107
VIII.	Conclusiones	113
IX.	Recomendaciones	114
X.	Referencias bibliográficas	115
XI.	Anexos	118

ABREVIATURAS

Å	Amstrong
SD	Desviación estándar
RSD	Desviación estándar relativa
Std	Estándar
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
Luz UV	Luz ultravioleta
µm	Micrómetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanómetro
N	Normalidad

RESUMEN

Se desarrolló y validó una nueva técnica de análisis por HPLC, que resultó ser efectiva, reproducible y confiable para la identificación y cuantificación de norfloxacino y fenazopiridina clorhidrato, asociados como principios activos en cápsulas orales. La técnica de análisis tomó en cuenta la preparación de muestra para que ambos activos puedan ser cuantificados en un solo sistema (fase móvil, columna cromatográfica, longitud de onda). Como paso previo a la validación de la técnica de análisis, se evaluó la adaptabilidad del sistema cromatográfico, asegurando de esta manera, el funcionamiento adecuado del sistema. Para el desarrollo de los parámetros de validación, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: Selectividad, Linealidad, Exactitud, Precisión y Robustez; resultados que fueron sometidos a evaluación estadística corroborando que la técnica analítica propuesta para la cuantificación de los principios activos es selectiva, lineal, exacta, precisa y robusta, así mismo la confiabilidad de la nueva técnica, garantizando de esta forma la calidad, eficacia e inocuidad del medicamento.

Palabras clave: Norfloxacino, fenazopiridina clorhidrato, cromatografía, validación, técnica analítica

ABSTRACT

It was developed and validated a new technique for HPLC analysis, which proved to be effective, reproducible and reliable for the identification and quantification of norfloxacin and phenazopyridine hydrochloride, associated as active partners in oral capsules. The technique of analysis took into account sample preparation for both assets can be quantified in a single system (mobile phase chromatographic column, wavelength). As step before to the validation of the technique of analysis, there was assessed the adaptability of the chromatographic system, assuring hereby, the suitable functioning of the system. For the development of validation parameters were taken into account the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness; results that were submitted to statistical evaluation which confirmed that the proposed analytical technique for the quantification of active principles is selective, linear, accurate, precise and robust, likewise the reliability of the new technique, guaranteeing the quality, efficacy and safety of the drug.

Key words: Norfloxacin, phenazopyridine hydrochloride, high-resolution liquid chromatography, validation, analytical technique.

I. INTRODUCCIÓN

La asociación Norfloxacino 400 mg y Fenazopiridina 50 mg en una forma farmacéutica oral ya se expende en el mercado farmacéutico del país como un antibacteriano – analgésico urinario de administración oral; la forma farmacéutica del producto corresponde a cápsula dura de gelatina, la cual está indicada en el tratamiento de infecciones del tracto urinario causados por gérmenes sensibles, complicadas o no complicadas, incluyendo cistitis u otros, causados por gérmenes susceptibles.

La técnica de análisis para la determinación cualitativa y cuantitativa de los principios activos que conforman la fórmula del medicamento no se encuentra descrita en obras oficiales: Farmacopea Americana, Farmacopea Británica, Farmacopea Japonesa, u otra; por lo cual se hace preciso desarrollar e implementar una técnica nueva de análisis para la identificación y cuantificación de dichos principios activos en una sola muestra.

De acuerdo a la exigencia y normatividad vigente referida a buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos, se considera sumamente necesario que los procesos que participan en el ciclo productivo, incluyendo los métodos de análisis aplicados tanto para la evaluación de materias primas como para productos terminados, se encuentren validados; es por esto que en nuestro medio durante los últimos años, las empresas farmacéuticas, en cumplimiento de las exigencias de calidad, están

orientando sus esfuerzos al desarrollo y ejecución de la validación de sus procesos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Validar prospectivamente una nueva técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para cuantificar Norfloxacino 500 mg y Fenazopiridina clorhidrato 50 mg en cápsulas de gelatina duras.

2.2. Objetivos Específicos

- Demostrar mediante la validación la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad del nuevo método de análisis.
- Cumplir con las exigencias de calidad de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos, de acuerdo a lo establecido por la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID).

III. ANTECEDENTES

Se han elaborado diversos trabajos de investigación sobre el tema, los cuales nos sirven como antecedente para el desarrollo del presente, los cuales son:

- **Br. Morales de la Cruz C.** “Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.
- **Br. Silva Cajas G.** “Validación del método de valoración de glimepirida presentación comprimido 4 mg por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.
- **Br. Azaña Sulca J, Br. Cornelio Bello J.** “Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargerverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2007.

Los trabajos mencionados muestran la necesidad de la validación de las técnicas analíticas y la importancia de su inclusión dentro de los programas de validación en los laboratorios de Control de Calidad, así como la ventaja en la reducción de costos por análisis y su aplicación a productos que se comercializan en el mercado.

IV. GENERALIDADES

4.1. Asociación Norfloxacin / Fenazopiridina clorhidrato

4.1.1. Norfloxacin

4.1.1.1. Propiedades físicas y químicas

Norfloxacin es una fluoroquinolona sintética, tiene el nombre químico de ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico. ⁽¹⁾

Formula Molecular: $C_{16}H_{18}FN_3O_3$

Peso Molecular: 319,33

Punto de Fusión: 221 °C

Aspecto: Polvo cristalino.

Color: Blanco a amarillo pálido.

Olor: Inodoro.

Solubilidad: Soluble en ácido acético glacial, ligeramente soluble en acetona y etanol, y muy ligeramente soluble en metanol y en agua. ⁽²⁾

Formula Estructural:

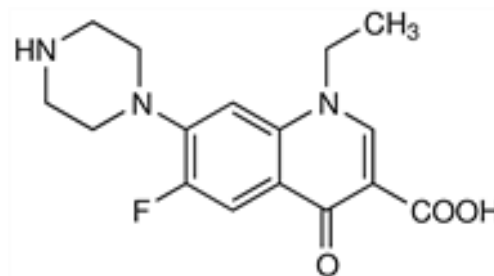


Fig. 1 Norfloxacin – Fórmula estructural

4.1.1.2. Propiedades farmacológicas

El Norfloxacinó es una fluoroquinolona sintética antibacteriana de amplio espectro, activa contra las bacterias aerobias grampositivas y gramnegativas; inhibiendo la síntesis bacteriana del ADN.

Vía oral produce una rápida absorción, teniendo a la hora después de administrar 400 mg una concentración en suero de 1,5 µg/mL. La semivida sérica es, aproximadamente, de 4 horas, e independiente de la dosis. El norfloxacinó se elimina por vía biliar y renal. La unión a proteínas es del 15%. ^{(3) (4)}

4.1.2. Fenazopiridina clorhidrato

4.1.2.1. Propiedades físicas y químicas

La Fenazopiridina clorhidrato, es un colorante sintético azoados, tiene el nombre químico de monoclórhidrato de 2,6-diamino-3-(fenilazo) piridina. ⁽¹⁾

Formula Molecular: $C_{11}H_{11}N_5 \cdot HCl$

Peso Molecular: 249,70

Punto de Fusión: 240 °C

Aspecto: Polvo cristalino.

Color: Rojo oscuro a violeta oscuro.

Olor: Inodoro.

Solubilidad: Muy ligeramente soluble en metanol y en agua. ⁽²⁾

Formula Estructural:

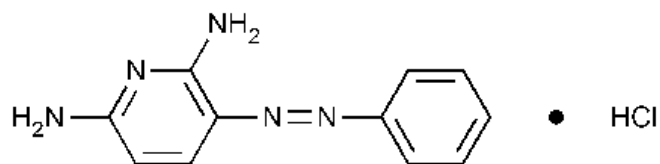


Fig. 2 Fenazopiridina clorhidrato – Fórmula estructural

4.1.2.2. Propiedades farmacológicas

La Fenazopiridina es un analgésico tópico y genera anestesia local sobre la mucosa del tracto urinario.

Se absorbe en el tracto gastrointestinal y sufre metabolismo hepático y en otros tejidos y su excreción es renal. Hasta el 90% de una dosis se excreta dentro de las 24 h, 41% como droga inalterada; 6,9% como anilina, 18% como N-acetil-p-aminofenol y 24% como p-aminofenol. ⁽⁴⁾

4.2. Cromatografía Líquida de Alta Performance - HPLC

4.2.1. Concepto

La cromatografía de líquidos de alta performance - HPLC (por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada para la separación, identificación cualitativa y determinación cuantitativa de componentes químicos en mezclas complejas. ⁽⁵⁾

Ampliamente utilizada en la industria farmacéutica por las ventajas que la técnica presenta, obteniendo un análisis cuantitativo rápido y preciso, es una operación automatizada, tiene una alta sensibilidad de detección pudiendo detectar nanogramos, picogramos, inclusive

niveles de femtogramos; y una de las ventajas más importantes es la susceptibilidad a la detección de un 60% a 80% de todos los componentes existentes. Por otra parte, las limitaciones que presenta, son que el sistema no cuenta con un detector universal como en otros sistemas, por lo tanto la detección es problemática si el analito no absorbe haces de luz UV, otra desventaja se da cuando el analito no es fácilmente ionizado; y por último, la técnica por HPLC, tiene muchos parámetros operacionales que lo hace dificultoso para un principiante.

(6)

Existiendo cuatro tipos principales de técnicas de HPLC que responden a las fuerzas moleculares básicas: fuerzas iónicas, fuerzas polares y fuerzas de dispersión; cada técnica específica a cada una de ellas: las fuerzas polares son el tipo dominante de las interacciones moleculares empleadas en HPLC de fase normal; las fuerzas de dispersión son empleados en HPLC de fase reversa; las fuerzas iónicas son empleados en HPLC de intercambio iónico; y el cuarto tipo de técnica de HPLC de exclusión de tamaño, se basa en la separación dinámica de las moléculas de acuerdo al tamaño que presente, sin la interacción del analito con la fase estacionaria. ⁽⁷⁾

4.2.2. Partes

4.2.2.1. Fase estacionaria y fase móvil.

Siendo la cromatografía definida como un método físico de separación por la cual los componentes son separados y distribuidos en dos fases,

una estacionaria y la otra móvil que se mueve en una determinada dirección. El sistema de HPLC presenta una gran versatilidad ya que abarca una serie de tipos de separación; teniendo cromatografía por adsorción donde el analito interactúa con una superficie sólida estacionaria y es desplazado por competencia con el eluyente por los sitios activos de la superficie. La separación por partición cromatográfica resulta de una distribución termodinámica entre dos fases líquidas; mientras que la cromatografía por cambio iónico, está gobernada por la interacción entre los analitos ionizados y la carga opuesta de la superficie de la fase estacionaria. En la cromatografía por exclusión de tamaño, la fuerza de resistencia para la separación es el tamaño físico de los analitos, lo que determina su accesibilidad a los diferentes tamaños de poros en la superficie de la fase estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. ⁽⁸⁾

El diseño de las columnas para cromatografía de líquidos tiene un doble propósito, el primero separa los solutos individuales apartados por las diferentes fuerzas moleculares que se producen entre los solutos y las dos fases, en segundo lugar, limita la dispersión o difusión de cada banda de soluto a fin de ser separados uno de otro, que van eluyendo discretamente. Siendo esta la capacidad de la columna de

contener la dispersión de pico que determina el diseño y las dimensiones de muchas partes del cromatografía.

Las columnas pueden estar divididas de acuerdo a la fase estacionaria o los materiales de apoyo; normalmente es una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales que se unen químicamente a un compuesto con un grupo funcional determinado. La unión más frecuente es la de silicagel por medio de una unión covalente, una de las mayores limitaciones es que por encima de pH 8-9 se disuelve y por debajo de pH 3 muchos compuestos se hidrolizan. El potencial de degradación incrementa también a elevadas temperaturas por encima de 60 – 70 °C; la silicagel es un sólido amorfo y poroso de gran área superficial (400 - 500 m²/g) siendo el diámetro de poro entre 80 a 300 Å. ^{(8) (9) (10)}

4.2.2.2. Bomba

El sistema de bombas puede ser considerado como el corazón del HPLC; las características de funcionamiento y rendimiento de la bomba fundamentalmente definen y limitan el tipo de separaciones que pueden ser realizadas; las características más importantes son: a) la reproducibilidad de caudal, b) el rango de caudal, c) la estabilidad de la presión. ^{(9) (10)}

Existen cuatro tipos de bombas: Las bombas de presión constante, las bombas de caudal constante, las bombas alternativas y las bombas de jeringa. ⁽¹⁰⁾

4.2.2.3. Inyectores

La muestra a analizar debe ser introducida en la fase móvil; una válvula de inyección adecuadamente diseñada y utilizada de manera correcta, asegura máxima eficiencia durante la cromatografía. Hoy en día la inyección manual es poco frecuente y sólo es justificado cuando la cantidad de muestra es limitada; la utilización de inyectores automáticos facilita la transferencia de muestras y el procesamiento automático de variables operativas como el control de volumen, número de inyecciones, el intervalo entre las inyecciones, ciclos de enjuague de las muestras; suprimiendo factor del error humano y mejorando la precisión del método. ⁽⁹⁾

4.2.2.4. Detectores

El propósito de un detector en un sistema de HPLC es identificar la presencia de componentes de interés del eluente proveniente de la columna del HPLC. El analito es reconocido por interacciones fisicoquímicas como por ejemplo la de absorbancia de radiación UV en una cierta longitud de onda.

Los detectores pueden ser clasificados dentro de dos categorías; los detectores basados en una propiedad de disolución que responden cualquier cambio de la alguna propiedad física de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden únicamente

a propiedades del analito, como la absorbancia UV, fluorescencia, o actividad electroquímica, que no son propias de la fase móvil.

Para la investigación de desarrollo de técnicas analíticas, existen siete especificaciones que son importantes: La linealidad, rango dinámico lineal, nivel de ruido, sensibilidad o concentración mínima detectable, sensibilidad a la presión, sensibilidad de flujo, sensibilidad de temperatura. ^{(6) (9) (10)}

4.2.2.5. Sistemas de toma y procesamiento de dato

Para toma de datos, procesamiento de datos y el reporte, el uso de un sistema informático integrado es esencial. Este sistema integrado, recibe y almacena la señal de los detectores e imprime cromatogramas completos, e incluso controla la mayoría de variables operativas como selección de muestras, válvulas de muestreo, condiciones del detector, entre otros; simplificando el trabajo tedioso de una selección manual de las condiciones operativas cromatográficas; con el objetivo de obtener el cromatograma con fracciones separadas e identificadas de cuya interpretación puede extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas de mezclas complejas. ⁽¹¹⁾

4.2.3. Parámetros Cromatográficos

4.2.3.1. Tiempo de Retención (t_R)

Cada analito específico está representado por un pico en el cromatograma; estos picos son simétricos y se asemejan a una curva de distribución normal tipo Gaussiana.

La distancia máxima del pico desde el punto de inyección, expresado en unidades de tiempo se llama tiempo de retención (t_R). El tiempo de retención de analito es dependiente del caudal de fase móvil; a mayor velocidad del caudal de flujo, más pequeño es el tiempo de retención de analito. El producto del tiempo de retención de analito y el caudal de fase móvil es el volumen de retención (V_R).⁽⁷⁾

4.2.3.2. Tiempo muerto

Es el tiempo requerido por un compuesto inerte para migrar desde la inyección en la columna sin retraso por la fase estacionaria. Por consiguiente, el tiempo muerto es idéntico con el tiempo de residencia del compuesto en la fase móvil.^{(7) (9)}

4.2.3.3. Factor de Retención (K)

La retención del analito se compone de dos partes: 1) El tiempo que el analito eluye en la fase móvil; 2) el tiempo que el analito es retenido en la fase estacionaria. La diferencia entre el tiempo total de retención (t_R) y el tiempo de demora, se denomina tiempo de retención reducido (t'_R), y la correspondiente diferencia entre el volumen de retención del analito y el volumen muerto se llama volumen de retención neta (V'_R).

La relación entre el volumen de retención reducido y del volumen muerto da un parámetro adimensional llamado factor de retención, (K) llamado también factor de capacidad. ⁽⁷⁾

$$K = V_R - V_0 / V_0 = V'_R / V_0 = t_R - t_0 / t_0$$

4.2.3.4. Selectividad (α)

La capacidad del sistema cromatográfico para discriminar diferentes analitos se llama selectividad (α). La selectividad se determina como la relación de los factores de retención de dos analitos, o la relación de los tiempos de retención reducida.

$$\alpha = K'_2 / K'_1$$

La retención relativa describe la capacidad de un sistema cromatográfico de discriminar entre dos compuestos; es independiente de la longitud de columna y la velocidad de flujo; por el contrario es dependiente de la temperatura y las propiedades de la fase móvil y la fase estacionaria. ^{(7) (9)}

4.2.3.5. Eficiencia (N)

La eficiencia es la medida del ensanchamiento de cinta cromatográfica y el número de los platos teóricos (N) en la columna y por lo general es calculada usando la ecuación siguiente:

$$N = 16 (t_{R1}/w)^2$$

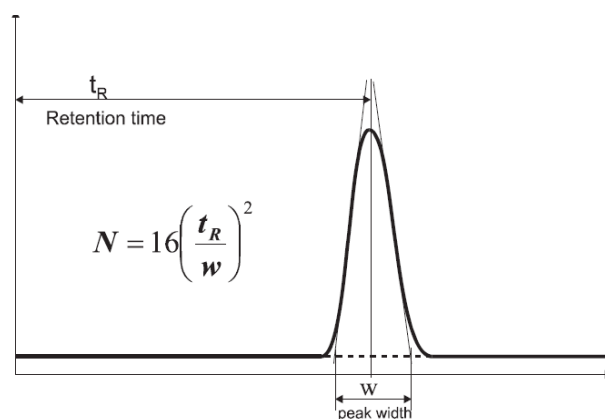


Fig. 3 Representación esquemática de las mediciones de eficiencia (Número de platos teóricos en la columna).

El número de los platos teóricos caracteriza la calidad de la columna y los fenómenos de transferencia de masas. Valores grandes para N califican la columna para separar mezclas complejas. ⁽⁷⁾

4.2.3.6. Resolución (R)

La resolución (R) está definida como la proporción de la distancia entre dos picos a la anchura media de los mismos. y este descriptor abarca tanto eficacia como selectividad. ⁽⁷⁾

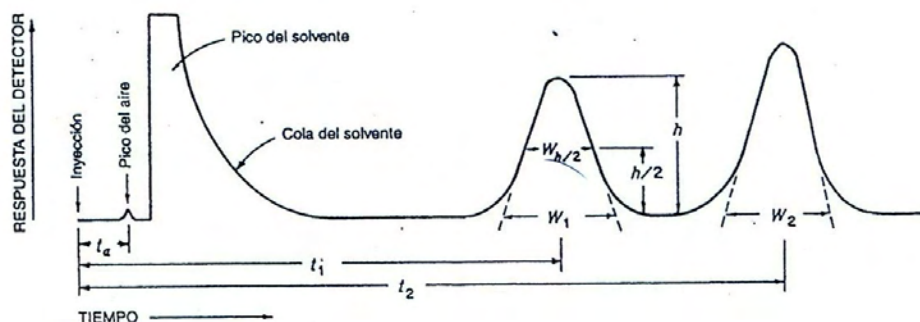


Fig. 4 Representación esquemática de las detectores cromatográficos, que simboliza una separación cromatográfica típica de dos analitos 1 y 2, donde t_1 y t_2 son los tiempos de retención respectivos, h , $h/2$, y $W_{h/2}$ son la altura, la mitad de la altura y el ancho a la altura media, respectivamente, W_1 y W_2 son los anchos respectivos de los picos 1 y 2 en la línea base.

4.3. Validación de Técnicas Analíticas

Para la producción y calidad en la industria farmacéutica, el objetivo principal es la fabricación de productos de alta calidad a un costo bajo; las exigencias de calidad son definidas por la necesidad del usuario, de la seguridad de producto, la eficacia y la facilidad de uso.

La FDA define el proceso de validación como "El establecimiento de pruebas documentadas que proporcionan un alto grado de certeza de que un proceso específico coherentemente producirá un producto que cumpla sus datos específicos predeterminados y atributos de calidad. "

(12)

Aunque los estudios de validación de técnicas analíticas se han realizado en la industria farmacéutica durante mucho tiempo, hoy en día es de uso rutinario debido a un mayor énfasis de la industria en los últimos años de garantía de calidad y mejora de la productividad. La

validación de técnicas analíticas es una parte necesaria del programa de gestión de calidad y es fundamental para una operación de producción eficiente y es parte integral de las Buenas prácticas de manufactura; todo el conjunto de procesos de validación están descritos en un Plan Maestro de Validaciones, este plan considera el desarrollo de actividades como la Calificación del Sistema que viene a ser la ejecución de pruebas para determinar si un componente de un proceso posee los atributos requeridos para trabajar correctamente la técnica analítica elegida, esta primera etapa considera:

- Calificación del diseño (DQ).- Define los datos específicos funcionales y operacionales del instrumento y sistemas auxiliares, de acuerdo a los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura. Es sumamente importante la selección cuidadosa de los procedimientos de prueba y límites de la aceptación definidos.
- Calificación de la Instalación (IQ).- Establece que el equipo y los sistemas auxiliares son entregado de acuerdo al diseño y especificación del fabricante, instalados en el ambiente seleccionado, y que este ambiente es conveniente para la operación y el empleo del instrumento.
- Calificación operacional (OQ).- Es el proceso de demostración que un instrumento funcionará según su especificación operacional en el ambiente seleccionado, el objetivo principal es de asegurar que el hardware y software del equipo se encuentran funcionales según los datos específicos requeridos en el documento DQ.

- Calificación del performance (PQ).- Establece por evidencia objetiva que el proceso, bajo condiciones delimitadas, produce constantemente un producto que cumple con las características de calidad deseadas y que las especificaciones del proceso no afectan al producto final.

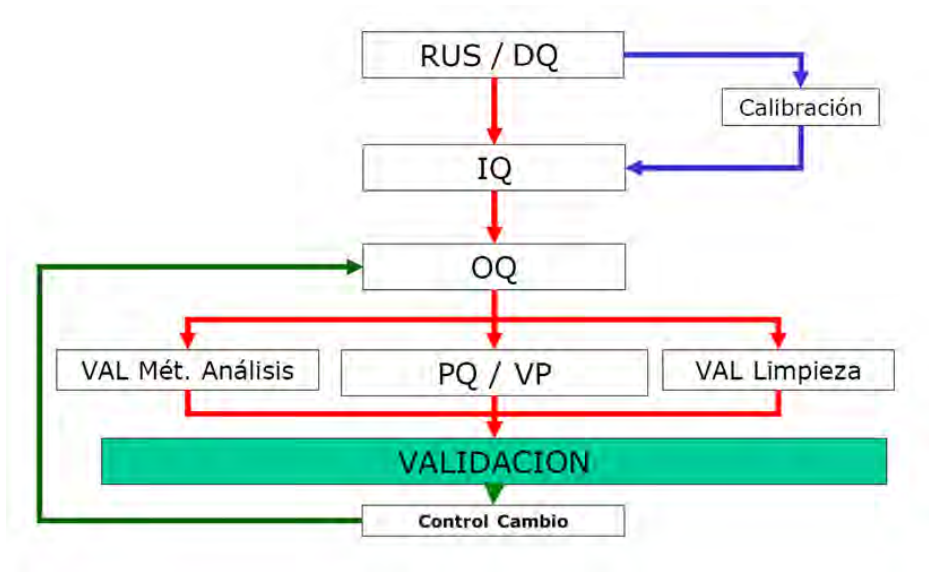


Fig. 5 Representación del flujo de la validación de un Método analítico esquemática dentro del Plan general de validaciones donde DQ: Calificación de diseño, IQ: Calificación de instalación, OQ: Calificación operacional, PQ: Calificación de Performance

Los métodos analíticos deben ser validados antes de su introducción en el uso de rutina; y revalidados al cambio de las condiciones del método validado (por ejemplo, un instrumento con características diferentes o muestras con una matriz diferentes); al cambio en el procedimiento analítico que se encuentra fuera del alcance de aplicación inicial del método; al cambio en la síntesis del principio

activo, al cambio de la composición del producto terminado. ^{(12) (13) (14)}
^{(15) (16)}

4.3.1. Parámetros de Validación

4.3.1.1. Exactitud

La exactitud está definida como la concordancia entre el resultado obtenido mediante el método elegido y el valor verdadero. La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto; las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada obteniéndose valores superiores al valor verdadero; las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos, con varias fases, extracciones, purificaciones, etc., que se traducen en una disminución de la recuperación.

Matemáticamente, la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero (error o error porcentual).

Estadísticamente, suele efectuarse un test de “t” de student para determinar si el valor medio del error y valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que se evalúe realizando un mínimo de nueve determinaciones de tres niveles de concentración, cubriendo así, el intervalo especificado. ^{(14) (17) (18) (19)}

4.3.1.2. Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o expresado de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones. ⁽¹⁸⁾

Dentro del término precisión se pueden distinguir el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere a la medida de precisión de los resultados de un método analítico efectuado por laboratorios diferentes y en condiciones diferentes (diferentes analistas, equipos, días, etc.). Una precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

La repetibilidad se refiere a la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo y en el curso de la misma serie de análisis efectuados durante un periodo de tiempo corto.

La precisión de un método analítico matemáticamente se expresa por la desviación estándar de la desviación estándar relativa.

Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad analizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento. ^{(14) (17) (18) (19)}

4.3.1.3. Selectividad

Se define como la capacidad para medir y/o identificar simultáneamente el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes relacionados o productos de degradación que puedan estar presentes en la matriz.

La selectividad de un método analítico, se determina comparando los resultados de análisis de muestras conteniendo impurezas, siendo un parámetro crucial para conseguir una buena exactitud por lo que es, en todos los casos, un criterio clave.

Los estudios de selectividad varían según el método aplicado:

- Métodos de identificación. Debe demostrar que el método funciona en presencia de otras sustancias que pueden interferir y de aquellas de composición similar.
- Ensayos de pureza. Debe garantizar que el método analítico permite la evaluación de impurezas cualitativa o cuantitativamente.
- Determinación cuantitativa de un componente. Debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia analizada sin interferencia de excipientes, productos de

degradación y/o impurezas cuando se determina el contenido en principio activo u otro componente (conservador, antioxidante) en un medicamento.

Para la determinación de la selectividad, se pueden plantear diferentes alternativas. Una de ellas es por la adición de interferencias, en estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con o sin analito en presencia o ausencia de dichas interferencias; para la determinación de una forma farmacéutica el grupo de muestras a preparar serían: matriz, analito, matriz + analito, matriz + analito + impurezas + productos de degradación.

La otra aplicación es utilizando pruebas confirmatorias con muestras sometidas a estrés para generar compuestos potencialmente interferentes, por lo cual, adquiere importancia para métodos que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica; estas condiciones, para lograr una degradación se somete a degradaciones de luz, humedad relativa, calor, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación.

La selectividad se confirma cuando un pico de la absorbancia es puro y no hay ninguna interferencia del placebo en el tiempo de retención correspondiente al analito. ^{(17) (18) (19)}

4.3.1.4. Linealidad

La linealidad de un método analítico incluye la proporcionalidad entre la concentración del analito y su capacidad de respuesta, así como el

intervalo de concentraciones del analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona además, con la sensibilidad de calibrado (representación gráfica del cociente entre la señal del analito y la señal del patrón frente a la concentración de analito de los patrones).

La determinación de la linealidad se realiza calculando la curva de calibración que relaciona respuesta (áreas, alturas, absorbancias, etc.) con una concentración de analito determinado. Generalmente se pretende obtener una recta de calibración, determinándose los parámetros de la recta de regresión; para algunos casos, la obtención del parámetro de linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, se tienen que someter a una transformación matemática. Los datos obtenidos a través de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se debería presentar el coeficiente de correlación, la intersección del eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que para establecer la linealidad se utilice normalmente un mínimo de 5 concentraciones. También recomienda que para la valoración de un fármaco (o de un producto terminado) se realice dentro del intervalo de 80% a 120% de la concentración de prueba. ⁽¹⁴⁾

(18) (19)

4.3.1.5. Robustez

La robustez de un método analítico evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico. Mide el grado de confiabilidad durante su uso normal. ⁽¹⁸⁾

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Desarrollo de la Técnica de Análisis

- Para determinar la longitud de onda con la cual se debe realizar la medición, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución 1200 DAD. El rango de prueba de las longitudes de onda es de 200 a 400 nm. Se determinó que la longitud de onda ideal para la lectura de ambos principios activos en un mismo cromatograma es de 254 nm.
- Debido a la naturaleza de ambos componentes, se toma en cuenta la solubilidad de ellos en diferentes sustancias. La fenazopiridina clorhidrato es soluble en agua, mientras que el norfloxacino es poco soluble. Se consideró en este caso, como referencia, la técnica interna del laboratorio para la identificación de norfloxacino. En base a ello se preparó una fase móvil en base a acetonitrilo, trietilamina y ácido fosfórico.
- La columna cromatográfica utilizada tiene una naturaleza no polar, es una RP Select B que se encuentra compuesta de octilsilano unido químicamente a sílice porosa. La naturaleza de la fase móvil permite que los analitos sean separados con facilidad por este tipo de columna y la separación de los picos dentro del mismo cromatograma sea adecuada.

Una vez determinados estos parámetros, se procedió al ensayo con la preparación de la muestra en base a cápsulas de gelatina dura que contienen norfloxacino y fenazopiridina clorhidrato, para seleccionar así

el volumen de inyección y el flujo adecuados; y estimar los tiempos de retención para cada uno de los picos. Luego se procedió a realizar la validación de la técnica analítica.

5.2. Procedimiento de la Técnica de Análisis

5.2.1. Materiales, equipos y reactivos

5.2.1.1. Materiales

- Columna cromatográfica.
- Matraz Erlenmeyer de 4 000 mL.
- Matraz de Kitazato de 1 000 mL.
- Frascos de fase móvil de 1 000 mL.
- Fiolas de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL y 1 000 mL.
- Pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 4 mL, 5 mL, 10 mL.
- Probetas de 5 mL, 10 mL, 250 mL ,500 mL y 1 000 mL.
- Vaso de precipitación de 100 mL.
- Mortero y pilón.
- Jeringas descartables de 5 mL.
- Viales de 1 ml para HPLC.
- Membranas filtrantes de nylon de 0,22 y 0,45 μm (25 mm de diámetro).
- Bombilla.
- Espátulas.
- Papel manteca.

5.2.1.2. Equipos

Los equipos empleados en esta validación han sido previamente calibrados y verificados (las fechas que se muestran a continuación corresponden al último mantenimiento de los equipos, previo a la validación).

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución

Marca: Agilent Technologies

Modelo: 1100 VWD

Módulo	Modelo	Nº de Serie
Desgasificador en Línea	G1379A	JP40720324
Bomba cuaternaria	G1311A	DE43607262
Automuestreador Líquido	G1313A	DE43627925
Compart. Termostatizado	G1316A	DE43643633
Detector Long. Onda Variable	G1314A	JP43825996

Último mantenimiento: Abril – 2008

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución

Marca: Agilent Technologies

Modelo: 1200 DAD

Módulo	Modelo	Nº de Serie
Desgasificador en Línea	G1322A	JP60652753
Bomba cuaternaria	G1311A	DE60555316
Automuestreador Líquido	G1329A	DE60555265
Compart. Termostatizado	G1316A	DE60555464
Detector Long. Onda Variable	G1315B	DE60555213

Último mantenimiento: Abril-2008

- Balanza Analítica

Marca: Mettler Toledo

Modelo: XS105DU

Serie: 1128411136

Último mantenimiento: Mayo – 2008

- Agitador Múltiple

Marca: IKA

Modelo: 3207100

Serie: 7.129941

- Ultrasonido (Sonicador)

Marca: WWR

Modelo: 150 C VWD

Serie: 05DS68706

- Baño María

Marca: Memmert

Modelo: W350

Serie: 920832

- Sistema de filtración

Marca: Millipore

5.2.1.3. Reactivos

- Acido fosfórico al 85% p/v Merck
- Acetonitrilo grado HPLC Fisher Scientific Chemicals

- Trietilamina Merck
- Metanol grado HPLC Merck
- Ácido acético Merck
- Ácido clorhídrico Q.P. Merck
- Hidróxido de sodio Merck
- Peróxido de hidrógeno Merck
- Agua calidad HPLC

5.2.2. Muestra y estándares

5.2.2.1. Muestra

Cápsulas de gelatina dura, conteniendo norfloxacino 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg.

Lote 0110547.

5.2.2.2. Estándares

- Norfloxacino USP

Lote : 200704068

Proveedor : ANDENEX

Potencia tal cual : 100,37%

Fecha de Expira : 2011-04-30

Nº Análisis : MPNC0701492

- Fenazopiridina Clorhidrato

Lote : PPH/061057

Proveedor : OPENPLUS

Potencia tal cual : 99,19%

Fecha de Expira : 2011-10-31

Nº Análisis : MPNC0700936

5.2.3. Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Performance

5.2.3.1. Condiciones cromatográficas

- Equipo : HPLC Agilent Technologies Modelo 1100 VWD.
- Columna : LiCrosphere 60 RP-select B 125 x 4 mm
- Sistema : Isocrático.
- Longitud de onda : 254 nm
- Flujo : 0,8 mL/min
- Volumen de inyección : 10 µL
- Temperatura : 40 °C
- Tiempo de retención
 - Norfloxacino : Aprox. 2,4 minutos
 - Fenazopiridina clorhidrato : Aprox. 10,5 minutos
- Tiempo total de corrida : 16 minutos.
- Método de cálculo : Estándar externo.

5.2.3.2. Preparación de fase móvil

- Preparación del ácido fosfórico 85% p/v 1:1000

En una fiola de 1 000 mL, colocar 1 mL de ácido ortofosfórico 85 % p/v. Adicionar agua calidad HPLC hasta cantidad suficiente para un litro y homogenizar.

- Fase móvil

Ac. fosfórico 85% p/v 1:1000 / ACN / Trietilamina

800 : 200 : 0,6

Filtrar la mezcla al vacío, por membrana 0,45 µm.

5.2.3.3. Preparación de las soluciones para análisis

- Preparación del estándar

Solución A: Pesar en una fiola de 50 mL aproximadamente 78 mg de fenazopiridina clorhidrato estándar. Adicionar 30 mL de la fase móvil. Sonicar luego por 20 minutos. Enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución A).

Solución B: Colocar en otra fiola de 50 mL aproximadamente 50 mg de norfloxacinó estándar. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A, enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Tomar 4 mL de la solución anterior (solución B), colocarlo en una fiola de 25 mL. Enrasar con fase móvil. Homogenizar. Filtrar por membrana 0,45 µm. Inyectar.

Concentración de norfloxacinó: 0,16 mg/mL

Concentración de fenazopiridina clorhidrato: 0,02 mg/mL

- Preparación de la muestra.

Tomar 10 cápsulas, pesar y sacar peso promedio del contenido. Vaciar el contenido y moler hasta polvo fino (de manera que la recubierta de la tableta de fenazopiridina quede totalmente pulverizada).

Colocar en una fiola de 100 mL el peso promedio del contenido de la cápsula (aproximadamente 562 mg de muestra pulverizada, equivalente a 400 mg de norfloxacino y 50 mg de fenazopiridina clorhidrato) y adicionar 5 mL de agua calidad HPLC.

Dejar humectar. Agregar luego 5 mL de ácido acético 6 N. Agregar 50 mL de fase móvil. Sonicar por 30 minutos y agitar mecánicamente 30 minutos más. Enrasar con fase móvil y homogenizar.

Tomar 4 mL de la solución anterior y colocarlo en una fiola de 100 mL, enrasar con fase móvil. Homogenizar. Filtrar por membrana 0,45 µm. Inyectar.

5.2.4. Adaptabilidad del Sistema Cromatográfico

La adaptabilidad del sistema cromatográfico, consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar que en el momento de utilización del método, el sistema (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para realizar la determinación. La evaluación de la adaptabilidad del sistema se recomienda para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales. ⁽¹⁸⁾

Los parámetros cromatográficos a considerar para la evaluación de la adaptabilidad del sistema son los siguientes:

- Factor de capacidad (K).
- Número de platos teóricos (N).
- Factor de asimetría o de cola (T).
- Resolución (R).
- Desviación estándar relativa (RSD).

Los criterios de aceptación y resultados se muestran en la Tabla 1.

PARÁMETROS	ANALITOS	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS
Factor de capacidad (K)	Norfloxacino	Mínimo 1	1,29536
	Fenazopiridina clorhidrato	Mínimo 1	8,82222
Número de platos teóricos (N)	Norfloxacino	Mínimo 2 000	2 818,26461
	Fenazopiridina clorhidrato	Mínimo 5 000	8 133, 44101
Factor de asimetría o de cola (T)	Norfloxacino	Máximo 3	2,36085
	Fenazopiridina clorhidrato	Máximo 2	1,30793
Resolución (R)	Entre Norfloxacino y Fenazopiridina clorhidrato	Mínimo 2	24,69541
Desviación estándar relativa (RSD)	Norfloxacino	Máximo 2 %	0,41859
	Fenazopiridina clorhidrato	Máximo 2 %	1,05409

Tabla 1. Parámetros Cromatográficos

5.2.4.1. Preparación de solución para adaptabilidad del sistema.

Solución A: En una fiola de 50 mL pesar aproximadamente 78 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar. Adicionar 30 mL de la fase móvil.

Sonicar luego por 20 minutos. Enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución A).

Solución B: En una fiola de 50 mL pesar aproximadamente 50 mg de Norfloxacinó estándar. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A. Enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Tomar 4 mL de la solución anterior (solución B), colocarlo en una fiola de 25 mL. Enrasar con fase móvil. Homogenizar. Filtrar por membrana 0,45 µm. Inyectar diez veces la solución de adaptabilidad del sistema.

Criterio de Aceptación: La desviación estándar relativa (RSD) debe ser menor de 2%. ⁽²⁰⁾

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

donde:

RSD : desviación estándar relativa

\bar{x} : media aritmética de la muestra evaluada

SD : desviación estándar

Fórmula para calcular la desviación estándar (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

donde:

n : tamaño de la muestra

x : valores individuales de la muestra evaluada.

Resultados: Se encuentran detallados en la tabla 2.

Nº INYECCION	ÁREA NORFLOXACINO	ÁREA FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO
1	3 385,09644	428,16321
2	3 390,33174	428,85922
3	3 406,32446	431,64844
4	3 401,27197	428,10431
5	3 393,79272	426,24783
6	3 398,68799	427,53961
7	3 392,65039	426,08157
8	3 361,31738	418,89972
9	3 373,23730	418,30487
10	3 404,11987	421,29187
PROMEDIO	3 390,68303	425,51407
SD	14,19302	4,48529
RSD	0.41859	1,05409

Tabla 2. Adaptabilidad del Sistema

5.3 Desarrollo de los Parámetros de Validación

5.3.1. Selectividad

5.3.1.1. Preparación de placebo.

Preparar el placebo de las cápsulas de gelatina dura que contienen norfloxacinó 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg.

Pesar 112 mg placebo y transferir a fiola de 100 mL. Someter la muestra a tratamiento según técnica analítica.

Criterio de Aceptación: No debe observarse picos de absorbancia en el tiempo de retención y en las condiciones de integración correspondiente a norfloxacinó y/o fenazopiridina clorhidrato.

Resultados: Ver Tabla 3.

5.3.1.2. Tratamiento por calor, luz, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación.

Someter a los analitos y al placebo al tratamiento por calor durante 7 días a 70 °C y exposición a la luz artificial por 07 días y proceder a su análisis según técnica analítica.

Las muestras tanto de los analitos y de los placebos preparados, son sometidas a hidrólisis ácida y básica con la adición de 25 mL de HCl 1 N y 25 mL de NaOH 1 N respectivamente y llevadas a baño maría a 70 °C por 30 minutos. Enfriar y agregar 25 mL de NaOH 1 N y 25 mL de HCl 1 N respectivamente. Analizar según técnica analítica.

Las muestras tanto de los analitos y de los placebos preparados, son sometidas a oxidación con 25 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Analizar según técnica analítica.

Criterio de Aceptación: En el caso de los analitos, el resultado debe ser expresado con la aparición de los picos en los tiempos de retención establecidos. Para el placebo, será expresado como presencia o ausencia de interferencias.

Resultados: Ver Tabla 3.

5.3.1.3. Preparación del placebo más la adición de los analitos.

Pesar el equivalente a 400 mg de norfloxacino; 50 mg de fenazopiridina clorhidrato y 112 mg de placebo. Transferir a fiola de 100 mL. Adicionar 5 mL de agua; dejar humectar. Agregar 5 mL de ácido acético 6 N, y agregar 50 mL de fase móvil, sonicar por 30 minutos y agitar

mecánicamente 30 minutos más. Enrasar con fase móvil y homogenizar. Tomar 4 mL de la solución anterior y colocar en fiola de 100 mL, enrasar con fase móvil. Homogenizar. Filtrar e inyectar.

Criterio de Aceptación: En el caso de los analitos, el resultado debe ser expresado con la aparición de los picos en los tiempos de retención establecidos. Para el placebo, será expresado como presencia o ausencia de interferencias.

Resultados: Ver Tabla 3.

MUESTRA TRATADA		CONDICIONES	RESULTADOS
ESTÁNDARES	AL 100 %	SEGÚN T. ANALÍTICA	Norfloxacino: Si hay respuesta aprox. a 2,5 min
			Fenazopiridina HCl: Si hay respuesta aprox. 10,7 min
PLACEBO	EXCIPIENTES	SEGÚN T. ANALÍTICA	No hay respuesta
FASE MÓVIL	AC. ORTOFOSFÓRICO 85% P/V 1:1000/ACN/TRIETILAMINA (800 : 200 : 0,6)	SEGÚN T. ANALÍTICA	No hay respuesta
PLACEBO	EXCIPIENTES	LUZ	No hay respuesta
PLACEBO + ESTÁNDAR	AL 100 %		Norfloxacino: Si hay respuesta aprox. a 2,5 min Fenazopiridina HCl: Si hay respuesta aprox. 10,7 min
PLACEBO	EXCIPIENTES	CALOR	No hay respuesta
PLACEBO + ESTÁNDAR	AL 100 %		Norfloxacino: Si hay respuesta aprox. a 2,5 min Fenazopiridina HCl: Si hay respuesta aprox. 10,7 min
PLACEBO	EXCIPIENTES	HIDRÓLISIS ÁCIDA	No hay respuesta
PLACEBO + ESTÁNDAR	AL 100 %		Norfloxacino: Si hay respuesta aprox. a 2,5 min Fenazopiridina HCl: Si hay respuesta aprox. 10,7 min
PLACEBO	EXCIPIENTES	HIDRÓLISIS BÁSICA	No hay respuesta
PLACEBO + ESTÁNDAR	AL 100 %		Norfloxacino: Si hay respuesta aprox. a 2,5 min Fenazopiridina HCl: Si hay respuesta aprox. 10,7 min
PLACEBO + ESTÁNDAR	AL 100 %	OXIDACIÓN	Norfloxacino: Si hay respuesta aprox. a 2,5 min Fenazopiridina HCl: Si hay respuesta aprox. 10,7 min

Tabla 3. Selectividad

5.3.2. Linealidad

5.3.2.1. Linealidad del sistema

a. Método Operatorio

Efectuar el análisis empleando estándares de referencia en las concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150% en torno a las concentraciones teóricas de cuantificación de los principios activos en la muestra. Preparar las muestras por triplicado.

Agregar las siguientes cantidades para obtener las soluciones en las concentraciones requeridas.

- Solución A:

Solución 50%: Pesar 39 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Proceder según técnica analítica.

Solución 75%: Pesar 58,5 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Proceder según técnica analítica.

Solución 100%: Pesar 78 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Proceder según técnica analítica.

Solución 125%: Pesar 97,5 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Proceder según técnica analítica.

Solución 150%: Pesar 117 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Proceder según técnica analítica.

- Solución B:

Solución 50%: Pesar 25 mg de Norfloxacinó estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A, enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Proceder según técnica analítica.

Solución 75%: Pesar 37,5 mg de Norfloxacinó estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A, enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Proceder según técnica analítica.

Solución 100%: Pesar 50 mg de Norfloxacinó estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A, enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Proceder según técnica analítica.

Solución 125%: Pesar 62,5 mg de Norfloxacinó estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A, enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Proceder según técnica analítica.

Solución 150%: Pesar 75 mg de Norfloxacinó estándar y colocar en una fiola de 50 mL. Adicionar 30 mL de la fase móvil, agitar 30 minutos. Luego sonicar por 10 minutos. Adicionar 4 mL de la solución A, enrasar con fase móvil. Homogenizar (solución B).

Proceder según técnica analítica.

La concentración final teórica de las soluciones preparadas se muestra en la tabla 4.

PORCENTAJE (%)	NORFLOXACINO	FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO
50	0,08 mg/mL	0,01 mg/mL
75	0,12 mg/mL	0,015 mg/mL
100	0,16 mg/mL	0,02 mg/mL
125	0,20 mg/mL	0,025 mg/mL
150	0,24 mg/mL	0,03 mg/mL

Tabla 4. Concentración Final Teórica (L. Sistema)

b. Cálculo estadístico.

b.1. Cálculo de la recta de regresión.

Se determina la curva de calibración, para el caso de una recta la función toma la forma ⁽²⁰⁾

$$y = bx + a$$

donde:

x : Cantidad de analito (variable independiente).

y : Área (variable dependiente).

b : Pendiente, llamada también coeficiente de regresión (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito).

a : ordenada al origen (intercepto, indica el error sistemático del método).

Fórmula para hallar el intercepto "a"
$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Fórmula para hallar la pendiente "b"
$$b = \frac{\sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

donde:

n : Número de mediciones (muestras).

Resultados: Ver tablas 5 y 6 (cálculo de la recta de regresión para Norfloxacino y Fenazopiridina clorhidrato respectivamente)

- Norfloxacino:

b: 22 324,414

a: - 70,10024

Ecuación de la recta: $y = 22\,324,41424x - 70,100$

Ver gráfica 1.

- Fenazopiridina clorhidrato:

b: 22430,983

a: - 6.845

Ecuación de la recta: $y = 22\,430,983x - 6,845$

Ver gráfica 2.

k	x	y	xy	x ²	y ²
50%	0,0098828	216,68499	2,14145442	0,0000976697	46 952,38489
	0,0098828	217,19527	2,14649741	0,0000976697	47 173,78531
	0,0098854	213,49287	2,11046242	0,0000977211	45 579,20554
75%	0,0149080	325,42934	4,85150060	0,0002222485	105 904,25533
	0,0148547	324,19366	4,81579956	0,0002206621	105 101,52918
	0,0148979	325,23779	4,84536007	0,0002219474	105 779,62004
100%	0,0198291	434,35150	8,61279933	0,0003931932	188 661,22555
	0,0197809	435,89384	8,62237246	0,0003912840	190 003,43975
	0,0198317	441,79920	8,76162919	0,0003932963	195 186,53312
125%	0,0247985	567,39504	14,07054590	0,0006149656	321 937,13142
	0,0247883	545,30888	13,51728011	0,0006144598	297 361,77461
	0,0247527	543,79763	13,46045960	0,0006126962	295 715,86239
150%	0,0297500	664,78955	19,77748911	0,0008850625	441 945,14579
	0,0297322	649,94305	19,32423675	0,0008840037	422 425,96824
	0,0297399	660,88404	19,65462526	0,0008844617	436 767,71433
Variables	$\sum x = 2,4099721$ $\sum x/n = 0,16066481$	$\sum y = 52\,749,71$ $\sum y/n = 3\,516,65$	$\sum xy = 9\,548,481564$	$\sum x^2 = 0,435282247$ $(\sum x)^2 = 5,807965523$	$\sum y^2 = 209\,513\,184,5$ $(\sum y)^2 = 2\,782\,532\,098$

donde:

k = 5 (número de series, concentraciones crecientes de analito)

N = 3 (número de réplicas, se analizan por triplicado)

n = 15 (número de determinaciones)

x = Concentración mg/mL

y = Áreas de respuesta

Tabla 5. Cálculo de la Recta de Regresión (L .Sistema Norfloxacino)

k	x	y	xy	x ²	y ²
50%	0,0098828	216,68499	2,14145442	0,0000976697	46 952,38489
	0,0098828	217,19527	2,14649741	0,0000976697	47 173,78531
	0,0098854	213,49287	2,11046242	0,0000977211	45 579,20554
75%	0,0149080	325,42934	4,85150060	0,0002222485	105 904,25533
	0,0148547	324,19366	4,81579956	0,0002206621	105 101,52918
	0,0148979	325,23779	4,84536007	0,0002219474	105 779,62004
100%	0,0198291	434,35150	8,61279933	0,0003931932	188 661,22555
	0,0197809	435,89384	8,62237246	0,0003912840	190 003,43975
	0,0198317	441,79920	8,76162919	0,0003932963	195 186,53312
125%	0,0247985	567,39504	14,07054590	0,0006149656	321 937,13142
	0,0247883	545,30888	13,51728011	0,0006144598	297 361,77461
	0,0247527	543,79763	13,46045960	0,0006126962	295 715,86239
150%	0,0297500	664,78955	19,77748911	0,0008850625	441 945,14579
	0,0297322	649,94305	19,32423675	0,0008840037	422 425,96824
	0,0297399	660,88404	19,65462526	0,0008844617	436 767,71433
Variables	$\sum x = 0,2973149$ $\sum x/n = 0,01982099$	$\sum y = 6 566,40$ $\sum y/n = 437,76$	$\sum xy = 146,7125122$	$\sum x^2 = 0,006631342$ $(\sum x)^2 = 0,08839615$	$\sum y^2 = 3 246 465,576$ $(\sum y)^2 = 43 117 564,97$

donde:

k = 5 (número de series, concentraciones crecientes de analito)

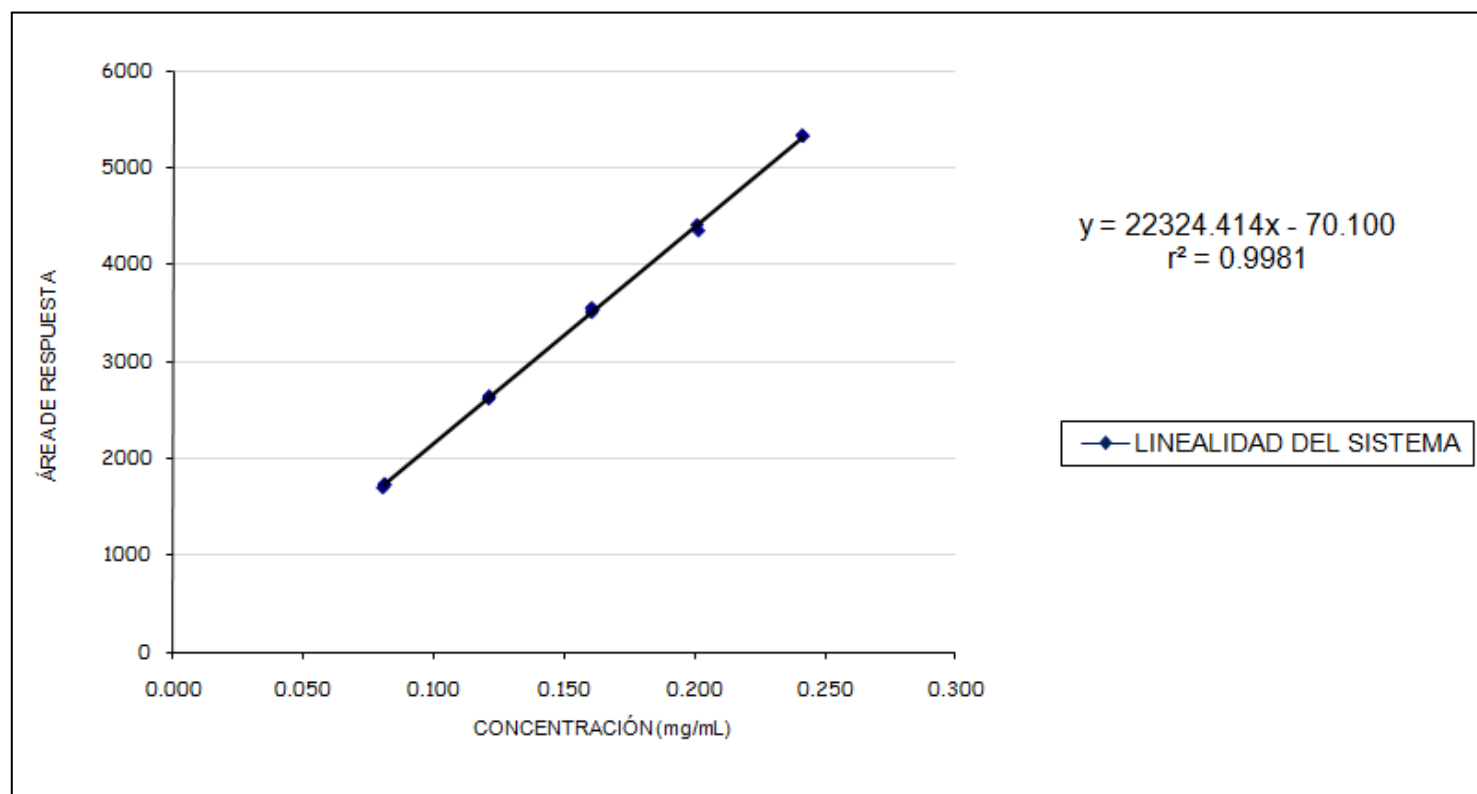
N = 3 (número de réplicas, se analizan por triplicado)

n = 15 (número de determinaciones)

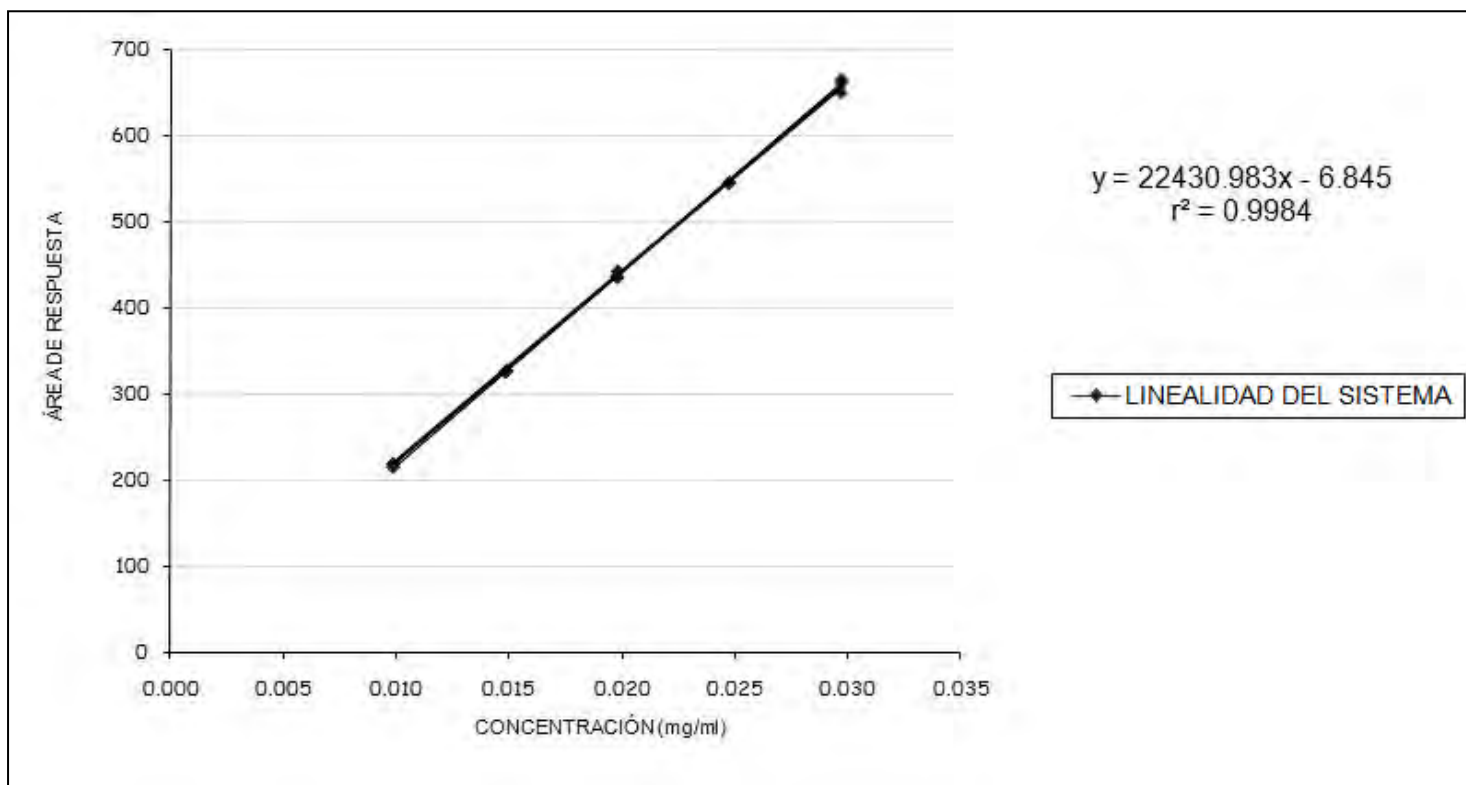
x = Concentración mg/mL

y = Áreas de respuesta

Tabla 6. Cálculo de la Recta de Regresión (L. Sistema Fenazopiridina Clorhidrato)



Gráfica 1. Linealidad del Sistema Norfloxacin



Gráfica 2. Linealidad del Sistema Fenazopiridina Clorhidrato

b.2. Cálculo coeficiente de correlación (r)

Refleja el grado de relación o ligazón entre las variables “x” (cantidad de analito) e “y” (área o respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación en una probabilidad elevada. ⁽²⁰⁾

Fórmula para hallar “r”:

$$r = \frac{\frac{\sum xy - \sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}}$$

Si:

r = 1 : Indica una recta perfectamente igual.

r = -1 : Indica una recta perfectamente lineal negativa.

r = 0 : Indica que no hay correlación entre x e y.

Criterio de aceptación: Mínimo 0,999

Resultados: Con los datos de las tablas 5 y 6 respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores para r:

- Norfloxacino : r = 0,99903
- Fenazopiridina clorhidrato : r = 0,99928

b.3. Cálculo coeficiente de determinación (r²).

El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina coeficiente de determinación e varianza total de “y”, que es explicada por el modelo lineal de regresión. Indica el grado de ajuste de la ecuación.

(20)

Criterio de aceptación: mínimo 0,990

Resultados: Con datos de las tablas 5 y 6 respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores para r^2 :

- Norfloxacino : $r^2 = 0,99806$
- Fenazopiridina clorhidrato : $r^2 = 0,99856$

b.4. Límite de confianza de la pendiente “b”.

Se calcula en función de su varianza S_b^2 .⁽²¹⁾

La fórmula para hallar la varianza de la pendiente “b” es la siguiente:

$$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}}$$

- S_b^2 Norfloxacino = 74 699,08607
- S_b^2 Fenazopiridina clorhidrato = 55 639,08888

La fórmula para hallar $S_{y,x}^2$ (Varianza del Error Experimental)

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - \sum xy}{n - 2}$$

- $S_{y,x}^2$ Norfloxacino = 3 591,87160
- $S_{y,x}^2$ Fenazopiridina clorhidrato = 41,076389

Para hallar la desviación estándar de la pendiente “b”

$$SD_b = \sqrt{S_b^2}$$

- SD_b Norfloxacino = 273,31134
- SD_b Fenazopiridina clorhidrato = 235,87940

$$RSD_b (\%) = \frac{SD_b}{b} \times 100$$

- $RSD_b (\%)$ Norfloxacino = 1,22427
- $RSD_b (\%)$ Fenazopiridina clorhidrato = 1,05158

Criterio de aceptación: Los límites de confianza de la pendiente b se hallan a partir de la expresión:

$$b \pm t_{\text{tabla}} \cdot SD_b$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $P = 0,05$). Estos intervalos de confianza no deberían incluir al cero.

Resultados:

- Intervalo de confianza de la pendiente “b” para Norfloxacino.

$$t_{\text{tabla}} = 2,160; \quad \text{para } 15 - 2 = 13 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$b = 22\,324,41424$$

$$b = 22\,324,41424 \pm 2,160 \times 273,31134$$

$$b = 21\,734,06175 \text{ hasta } 22\,914,76673$$

- Intervalo de confianza de la pendiente “b” para Fenazopiridina

Clorhidrato

$$t_{\text{tabla}} = 2,160; \quad \text{para } 15 - 2 = 13 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$b = 22\,430,98251$$

$$b = 22\,430,98251 \pm 2,160 \times 235,87939$$

$$b = 21\,921,48303 \text{ hasta } 22\,940,48200$$

b.5. Determinación del test estadístico de la pendiente “b”

Se establece una comparación entre t_{exp} y t_{tabla} ⁽²¹⁾

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{SD_b}$$

Siendo $t_{\text{tabla}} = 2,160$; para $15 - 2 = 13$ grados de libertad; y $p = 0,05$

Test de Hipótesis para la pendiente “b”:

- HIPÓTESIS NULA (H_0): “b” es igual a cero ($b = 0$)
- HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1): “b” es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$).

Criterio de aceptación: El valor t_{exp} es mayor que t_{tabla} . Entonces la hipótesis nula se rechaza, Por lo tanto $b \neq 0$.

Resultados:

$t_{tabla} = 2,160$; para $15 - 2 = 13$ grados de libertad; y $p = 0,05$.

- Norfloxacino : $t_{exp} = 81,68126$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_{exp} = 95,05133$

Como $t_{exp} > t_{tabla}$, en ambos casos, si existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente b es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$).

b.6. Límite de confianza del intercepto “a”

Se calcula en función de su varianza S_a^2 .⁽²¹⁾

La fórmula para hallar la varianza del término independiente “a” es la siguiente:

$$S_a^2 = S_b^2 \cdot \frac{\sum x^2}{n}$$

- S_a^2 Norfloxacino = 28 923,31443
- S_a^2 Fenazopiridina clorhidrato = 327,88542

Para hallar la desviación estándar del término independiente “a”

$$SD_a = \sqrt{S_a^2}$$

- SD_a Norfloxacino = 170,06856
- SD_a Fenazopiridina clorhidrato = 18,10761

$$RSD_a (\%) = \frac{SD_a}{a} \times 100$$

- $RSD_a (\%)$ Norfloxacino = 242,60766
- $RSD_a (\%)$ Fenazopiridina clorhidrato = 264,55403

Criterio de aceptación: Los límites de confianza del término independiente “a” se hallan a partir de la expresión:

$$a \pm t_{\text{tabla}} \cdot SD_a$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para n - 2 grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente P = 0,05). En los intervalos de confianza debe estar incluido el cero.

Resultados:

- Intervalo de confianza del término independiente “a” para Norfloxacino.

$t_{\text{tabla}} = 2,160$; para 15 - 2 = 13 grados de libertad; y p = 0,05

a = - 70,100247

$$a = - 70,10024 \pm 2,160 \times 170,06856$$

$$a = - 437,44833 \text{ hasta } 297,24785$$

- Intervalo de confianza del término independiente “a” para Fenazopiridina Clorhidrato.

$$t_{\text{tabla}} = 2,160; \quad \text{para } 15 - 2 = 13 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$a = - 6,84458$$

$$a = - 6,84458 \pm 2,160 \times 18,10761$$

$$a = - 45,95702 \text{ hasta } 32,26786$$

b.7. Determinación del test estadístico del término independiente “a”

Se establece una comparación entre t_{exp} y t_{tabla} ⁽²¹⁾

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{SD_a}$$

Siendo $t_{\text{tabla}} = 2,160$; para $15 - 2 = 13$ grados de libertad; y $p = 0,05$

Test de Hipótesis para el término independiente “a”:

- HIPÓTESIS NULA (H_0): “a” es igual a cero ($a = 0$)

Criterio de aceptación: El valor t_{exp} es menor que t_{tabla} . Entonces el valor de “a” es aceptable.

Resultados:

$$t_{\text{tabla}} = 2,160; \text{ para } 15 - 2 = 13 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

- Norfloxacin : $t_{\text{exp}} = 0,41219$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_{\text{exp}} = 0,37800$

Como $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$, en ambos casos, si existe una correlación lineal significativa, entonces el valor de “a” es aceptable.

b.8. Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

Es la relación entre la lectura y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente; por este motivo se puede tomar la desviación estándar relativa (RSD) de los factores de respuesta como una expresión de linealidad.

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.2.4.1. ⁽²²⁾

Criterio de aceptación: $\text{RSD (factores de respuesta)} \leq 2\%$

Resultados: Ver Tabla 7.

- Norfloxacin: RSD = 1,8475
- Fenazopiridina clorhidrato: RSD = 1,3797

b.9. Test Estadístico para el coeficiente de correlación (r).

En este cual se calcula el valor de t_r (test de regresión) con $n - 2$ grados de libertad y un intervalo de confianza de 95% ($\alpha = 0,05$, donde α es probabilidad de cometer error, y $1 - \alpha$ es grado de

confianza), se compara con el valor de t_{tabla} (test tabulado) (Ver anexo 2) para el nivel de confianza requerido.

Fórmula para hallar $t_r^{(21)}$

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Criterio de aceptación: Si el valor de t_r es mayor a t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$).

Resultados:

$t_{\text{tabla}} = 2,160$; para $15 - 2 = 13$ grados de libertad; y $p = 0,05$

- Norfloxacino : $t_r = 81.68126$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_r = 95,09514$

Como en ambos casos, el t regresión $>$ t tabla. Si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$)

ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	ÁREAS (RESPUESTA)	FACTOR DE RESPUESTA
NORFLOXACINO	0,0801354	1 691,24312	21 104,81909
	0,0807457	1 731,54114	21 444,37586
	0,0809062	1 719,13420	21 248,48528
	0,1207009	2 610,61645	21 628,80683
	0,1208937	2 626,89787	21 728,98894
	0,1208937	2 639,56413	21 833,76082
	0,1602066	3 505,80924	21 883,05126
	0,1606884	3 533,12353	21 987,42118
	0,1601745	3 551,12459	22 170,34915
	0,2004509	4 542,70801	22 662,44756
	0,2005794	4 413,38428	22 003,17819
	0,2011254	4 351,72428	21 636,87073
	0,2408880	5 341,16976	22 172,83451
	0,2403099	5 160,59945	21 474,76841
	0,2412734	5 331,07178	22 095,56370
	PROMEDIO		21 805,0481
	SD		402,8515
	RSD		1,8475
FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO	0,0098828	216,68499	21 925,46546
	0,0098828	217,19527	21 977,09860
	0,0098854	213,49287	21 596,78617
	0,0149080	325,42934	21 829,17494
	0,0148547	324,19366	21 824,31554
	0,0148979	325,23779	21 831,11647
	0,0198291	434,35150	21 904,75110
	0,0197809	435,89384	22 036,09745
	0,0198317	441,79920	22 277,42453
	0,0247985	567,39504	22 880,21614
	0,0247883	545,30888	21 998,63968
	0,0247527	543,79763	21 969,22477
	0,0297500	664,78955	22 345,86723
	0,0297322	649,94305	21 859,90441
	0,0297399	660,88404	22 222,13390
	PROMEDIO		22 031,8811
	SD		303,9792
	RSD		1,3797

donde : SD : Desviación estándar
RSD : Desviación estándar relativa

Tabla 7. Factores de Respuesta I (Áreas vs Concentración)

5.3.2.2. Linealidad del método

a. Método Operatorio

Realizar la adición de analito al placebo. Efectuar el análisis empleando estándares de referencia en las concentraciones de 80%, 100% y 120% en torno a las concentraciones teóricas de cuantificación de los principios activos en la muestra. Preparar las muestras por triplicado.

Agregar las siguientes cantidades para obtener las soluciones en las concentraciones requeridas.

- Solución 80%: Pesar 202 mg de placebo; 320 mg de Norfloxacino estándar y 40 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y llevar a fiola de 100 mL. Proceder según técnica analítica.
- Solución 100%: Pesar 112 mg de placebo; 400 mg de Norfloxacino estándar y 50 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y llevar a fiola de 100 mL. Proceder según técnica analítica.
- Solución 120%: Pesar 22 mg de placebo; 480 mg de Norfloxacino estándar y 60 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y llevar a fiola de 100 mL. Proceder según técnica analítica.

La concentración final teórica de las soluciones preparadas se muestra en la tabla 8.

PORCENTAJE (%)	CONCENTRACIÓN FINAL TEÓRICA	
	NORFLOXACINO	FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO
80	0,0128 mg/mL	0,016 mg/mL
100	0,16 mg/mL	0,02 mg/mL
120	0,192 mg/mL	0,024 mg/mL

Tabla 8. Concetración Final Teórica (L. Método)

b. Cálculo estadístico.

b.1. Cálculo de la recta de regresión

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.1.)

Se determina la curva de calibración, para el caso de una recta la función toma la forma:

$$y = bx + a$$

Resultados: Ver tablas 9 y 10 (cálculo de la recta de regresión para Norfloxacino y Fenazopiridina clorhidrato respectivamente).

- Norfloxacino:

b: 21 787,420

a: - 80,489

Ecuación de la recta: $y = 21\,787,420x - 80,489$

Ver gráfica 3.

- Fenazopiridina clorhidrato:

b: 21 228,809

a: 4,87401

Ecuación de la recta: $y = 21\,228,809x + 4,874$

Ver gráfica 4.

K	X	y	xy	x ²	y ²
80%	0,128538	2 744,30485	352,74745681	0,0165220174	7 531 209,10973
	0,128482	2 696,93270	346,50730716	0,0165076243	7 273 445,98833
	0,128482	2 717,91911	349,20368309	0,0165076243	7 387 084,28850
100%	0,160652	3 430,82739	551,16928186	0,0258090651	11 770 576,57997
	0,160572	3 407,97111	547,22473707	0,0257833672	11 614 267,08659
	0,160628	3 415,07088	548,55600531	0,0258013544	11 662 709,11542
120%	0,192779	4 137,91553	797,70321796	0,0371637428	17 122 344,93342
	0,192682	4 099,39177	789,87900503	0,0371263531	16 805 012,88394
	0,192734	4 120,04085	794,07195318	0,0371463948	16 974 736,60567
Variables	$\sum x = 1,445549$ $\sum x/n = 0,1606156$	$\sum y = 30\,770,37419$ $\sum y/n = 3\,418,9305$	$\sum xy = 5\,077,062647$	$\sum x^2 = 0,238368$ $(\sum x)^2 = 2,089612$	$\sum y^2 = 108\,141\,386,59159$ $(\sum y)^2 = 946\,815\,927,79262$

donde:

k = 5 (número de series, concentraciones crecientes de analito)

N = 3 (número de réplicas, se analizan por triplicado)

n = 15 (número de determinaciones)

x = Concentración mg/mL

y = Áreas de
respuesta

Tabla 9. Cálculo de la Recta de Regresión (L. Método Norfloxacino Std.)

k	X	y	xy	x ²	y ²
80%	0,015918	343,40418	5,46630774	0,0002533827	117 926,43084
	0,015930	342,78908	5,46063004	0,0002537649	117 504,35337
	0,015858	340,81878	5,40470421	0,0002514762	116 157,44080
100%	0,019890	426,91120	8,49126377	0,0003956121	182 253,17269
	0,019854	425,24692	8,44285235	0,0003941813	180 834,94297
	0,019838	428,03859	8,49142955	0,0003935462	183 217,03453
120%	0,023833	511,55990	12,19200710	0,0005680119	261 693,53129
	0,023770	508,58239	12,08900341	0,0005650129	258 656,04742
	0,023833	510,62355	12,16969107	0,0005680119	260 736,40981
Variables	$\sum x = 0,178724$ $\sum x/n = 0,01985822$	$\sum y = 3\ 837,97459$ $\sum y/n = 426,44162$	$\sum xy = 78,207889$	$\sum x^2 = 0,003643$ $(\sum x)^2 = 0,031942$	$\sum y^2 = 1\ 678\ 979,36371$ $(\sum y)^2 = 14\ 730\ 048,953486$

donde:

k = 3 (número de series, concentraciones crecientes de analito)

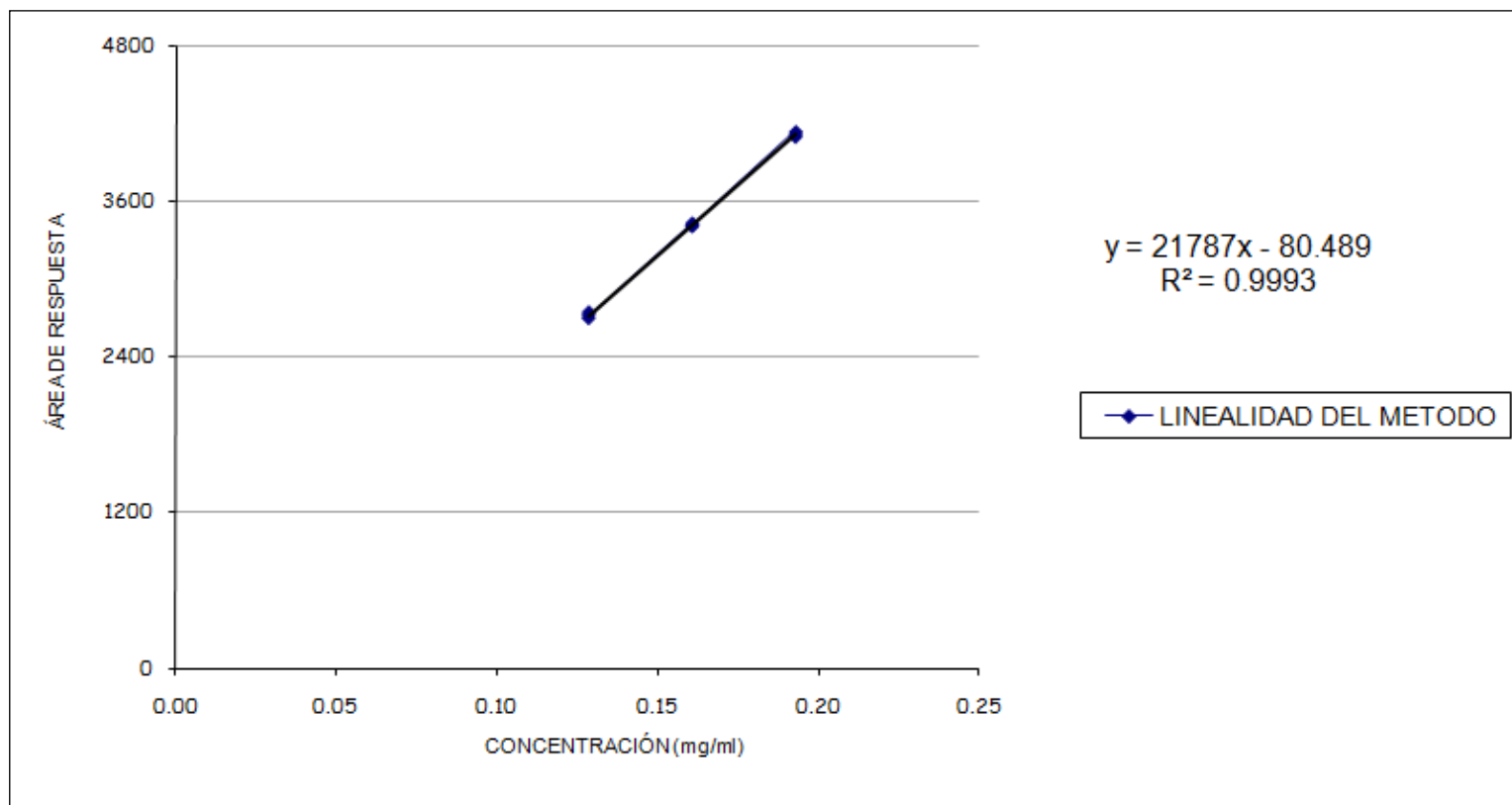
N = 3 (número de réplicas, se analizan por triplicado)

n = 9 (número de determinaciones)

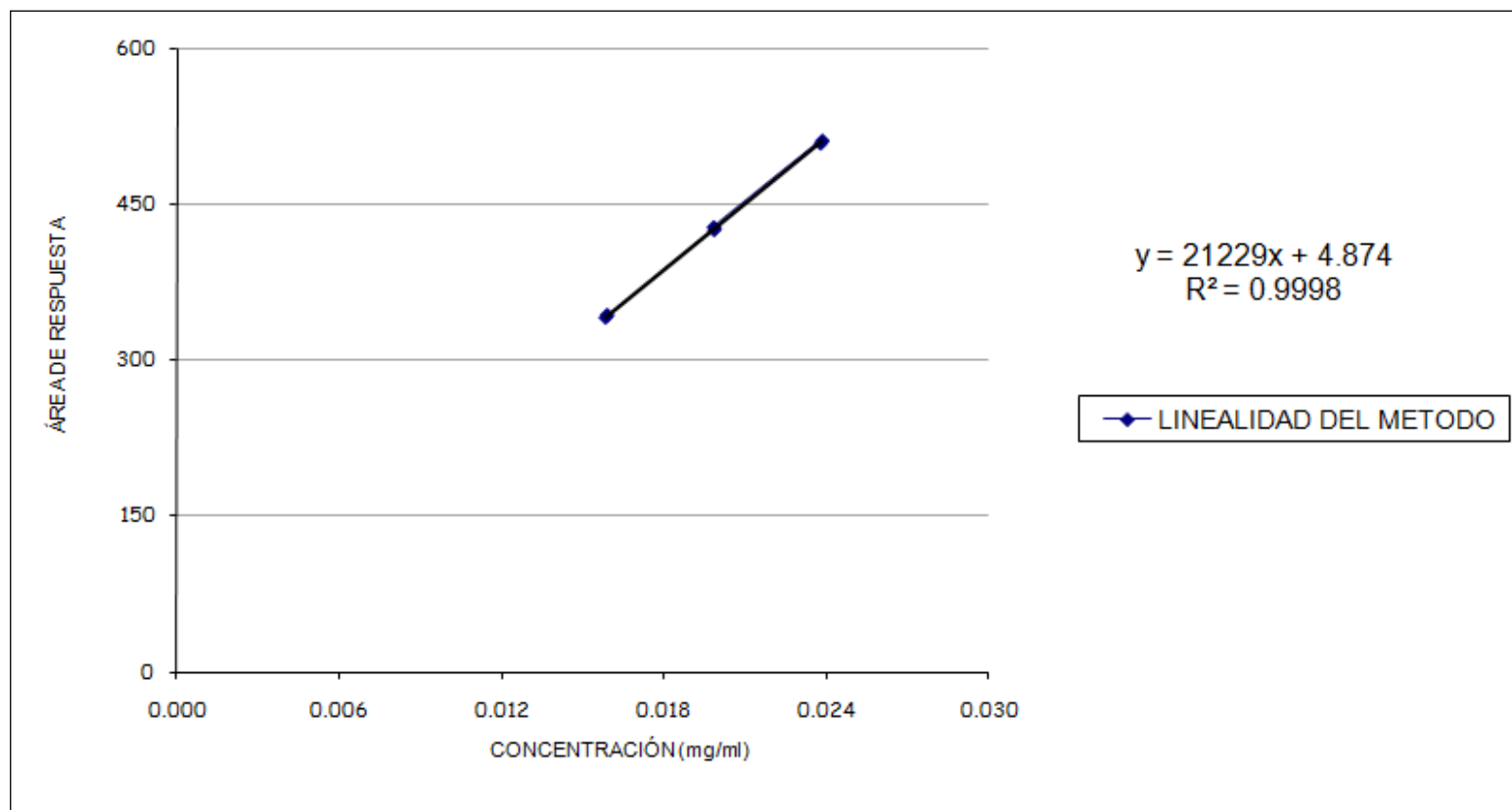
x = Concentración mg/mL

y = Áreas de
respuesta

Tabla 10. Cálculo de la Recta de Regresión (L. Método Fenazopiridina Clorhidrato Std.)



Gráfica 3. Linealidad del Método Norfloxacino



Gráfica 4. Linealidad del Método Fenazopiridina Clorhidrato

b.2. Cálculo coeficiente de correlación (r)

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.2.)

Criterio de aceptación: Mínimo 0,999

Resultados: Con los datos de las tablas 9 y 10 respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores para r:

- Norfloxacino : $r = 0,99966$
- Fenazopiridina clorhidrato : $r = 0,99991$

b.3. Cálculo coeficiente de determinación
(r^2)

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.3.)

Criterio de aceptación: Mínimo 0,990

Resultados: Con los datos de las tablas 9 y 10 respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores para r^2 :

- Norfloxacino : $r^2 = 0,99933$
- Fenazopiridina clorhidrato : $r^2 = 0,99982$

b.4. Límite de confianza de la pendiente “b”

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.4.)

Se calcula en función de su varianza S^2_b :

- S^2_b Norfloxacinó = 45 568,3943
- S^2_b Fenazopiridina clorhidrato = 11 705,44466

Varianza del Error Experimental ($S^2_{y,x}$)

- $S^2_{y,x}$ Norfloxacinó = 281,99738
- $S^2_{y,x}$ Fenazopiridina clorhidrato = 1,09866

Desviación estándar de la pendiente b

- SD_b Norfloxacinó = 213,46755
- SD_b Fenazopiridina Clorhidrato = 108,19170

Desviación estándar relativa de la pendiente b

- RSD_b (%) Norfloxacinó = 0,97977
- RSD_b (%) Fenazopiridina Clorhidrato = 0,50965

Criterio de aceptación: Los límites de confianza de la pendiente b se hallan a partir de la expresión:

$$b \pm t_{\text{tabla}} \cdot SD_b$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para n - 2 grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $P = 0,05$). Estos intervalos de confianza no deberían incluir al cero.

Resultados:

- Intervalo de confianza de la pendiente “b” para Norfloxacin.

$$t_{\text{tabla}} = 2,365; \quad \text{para } 9 - 2 = 7 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$b = 21\,787,42004$$

$$b = 21\,787,42004 \pm 2,365 \times 213,46755$$

$$b = 21\,282,56928 \text{ hasta } 22\,292,27080$$

- Intervalo de confianza de la pendiente “b” para Fenazopiridina clorhidrato.

$$t_{\text{tabla}} = 2,365; \quad \text{para } 9 - 2 = 7 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$b = 21\,228,80902$$

$$b = 21\,228,80902 \pm 2,365 \times 108,19170$$

$$b = 20\,972,93565 \text{ hasta } 21\,484,68239$$

b.5. Determinación del test estadístico de la pendiente “b”.

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.5.)

Se establece una comparación entre t_{exp} y t_{tabla}

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{SD_b}$$

Siendo $t_{\text{tabla}} = 2,365$; para $9 - 2 = 7$ grados de libertad; y $p = 0,05$

Test de Hipótesis para la pendiente “b”:

- HIPÓTESIS NULA (H_0): “b” es igual a cero ($b = 0$)

- HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1): “b” es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$).

Criterio de aceptación: El valor t_{exp} es mayor que t_{tabla} . Entonces la hipótesis nula se rechaza, Por lo tanto $b \neq 0$.

Resultados:

$t_{tabla} = 2,365$; para $9 - 2 = 7$ grados de libertad y $p = 0,05$.

- Norfloxacino : $t_{exp} = 102,06432$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_{exp} = 196,21476$

Como $t_{exp} > t_{tabla}$, en ambos casos, si existe una correlación lineal significativa, entonces la pendiente b es significativamente diferente de cero ($b \neq 0$)

b.6. Límite de confianza del intercepto “a”

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.6.)

Se calcula en función de su varianza S_a^2 .

- S_a^2 Norfloxacino = 1 206,89180
- S_a^2 Fenazopiridina clorhidrato = 4,73810

Desviación estándar del término independiente “a”

- SD_a Norfloxacino = 34,74035
- SD_a Fenazopiridina clorhidrato = 2,17672

Desviación estándar relativa del término independiente “a”

- RSD_a (%) Norfloxacino = 43,16137
- RSD_a (%) Fenazopiridina clorhidrato = 44,65970

Criterio de aceptación: Los límites de confianza del término independiente “a” se hallan a partir de la expresión:

$$a \pm t_{\text{tabla}} \cdot SD_a$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $P = 0,05$). En los intervalos de confianza debe estar incluido el cero.

Resultados:

- Intervalo de confianza del término independiente “a” para Norfloxacino

$$t_{\text{tabla}} = 2,365; \quad \text{para } 9 - 2 = 7 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$a = - 80,48945$$

$$a = - 80,48945 \pm 2,365 \times 34,74035$$

$$a = - 162,65038 \text{ hasta } 1,67148$$

- Intervalo de confianza del término independiente “a” para Fenazopiridina clorhidrato

$$t_{\text{tabla}} = 2,365; \quad \text{para } 9 - 2 = 7 \text{ grados de libertad; y } p = 0,05$$

$$a = 4,87401$$

$$a = 4,87401 \pm 2,365 \times 2,17672$$

$$a = - 0,27393 \text{ hasta } 10,02195$$

b.7. Determinación del test estadístico del término independiente “a”

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.7.)

Se establece una comparación entre t_{exp} y t_{tabla}

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{SD_a}$$

Siendo $t_{\text{tabla}} = 2,365$; para $9 - 2 = 7$ grados de libertad; y $p = 0,05$

Test de Hipótesis para el término independiente “a”:

- HIPÓTESIS NULA (H_0): “a” es igual a cero ($a = 0$)

Criterio de aceptación: El valor t_{exp} es menor que t_{tabla} . Entonces el valor de “a” es aceptable.

Resultados:

$t_{\text{tabla}} = 2,365$; para $9 - 2 = 7$ grados de libertad y $p = 0,05$

- Norfloxacino : $t_{\text{exp}} = 2,31689$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_{\text{exp}} = 2,23916$

Como $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ para ambos casos, si existe una correlación lineal significativa, entonces el valor de “a” es aceptable.

b.8. Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.2.4.1.

Criterio de aceptación: $RSD (\text{factores de respuesta}) \leq 2\%$

Resultados: Ver tabla 11.

- Norfloxacino: $RSD = 0,6578$
- Fenazopiridina clorhidrato: $RSD = 0,3036$

b.9. Test Estadístico para el coeficiente de correlación (r).

Calcular de la misma manera que lo indicado en 5.3.2.1. (b.9.)

Criterio de aceptación: Si el valor de t_r ($t_{\text{regresión}}$) es mayor a t_{tabla} , existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$).

Resultados:

$t_{\text{tabla}} = 2,365$; Para $9 - 2 = 7$ grados de libertad; y $p = 0,05$

- Norfloxacino : $t_r = 102,06950$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_r = 196,10766$

Como en ambos casos, el $t_r > t_{\text{tabla}}$. Si existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$).

ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	ÁREAS (RESPUESTA)	FACTOR DE RESPUESTA
NORFLOXACINO	0,128538	2 744,30485	21 350,14432
	0,128482	2 696,93270	20 990,74345
	0,128482	2 717,91911	21 154,08470
	0,160652	3 430,82739	21 355,64693
	0,160572	3 407,97111	21 223,94384
	0,160628	3 415,07088	21 260,74458
	0,192779	4 137,91553	21 464,55542
	0,192682	4 099,39177	21 275,42671
	0,192734	4 120,04085	21 376,82428
	PROMEDIO		21 272,4571
	SD		139,9215
	RSD		0,6578
FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO	0,015918	343,40418	21 573,32454
	0,015930	342,78908	21 518,46077
	0,015858	340,81878	21 491,91449
	0,019890	426,91120	21 463,60985
	0,019854	425,24692	21 418,70253
	0,019838	428,03859	21 576,70078
	0,023833	511,55990	21 464,35195
	0,023770	508,8239	21 395,97770
	0,023833	510,62355	21 425,06399
	PROMEDIO		21 480,9007
	SD		65,2141
	RSD		0,3036

donde : SD : Desviación estándar
RSD : Desviación estándar relativa

Tabla 11. Factores de Respuesta II (Áreas vs Concentración)

5.3.3. Exactitud

a. Método Operatorio

Efectuar el análisis empleando estándares de referencia en la concentración de 100% preparados como indica la técnica analítica.

Además preparar estándares de referencia en las concentraciones de 80%, 100% y 120% en torno a las concentraciones teóricas de cuantificación de los principios activos en la muestra, a las cuales debe agregarse placebo. Preparar las muestras por triplicado.

Agregar las siguientes cantidades para obtener las soluciones en las concentraciones requeridas.

- Solución 80%: Pesar 202 mg de placebo; 320 mg de Norfloxacino estándar y 40 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y llevar a fiola de 100 mL. Proceder según técnica analítica.
- Solución 100%: Pesar 112 mg de placebo; 400 mg de Norfloxacino estándar y 50 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y llevar a fiola de 100 mL. Proceder según técnica analítica.
- Solución 120%: Pesar 22 mg de placebo; 480 mg de Norfloxacino estándar y 60 mg de Fenazopiridina clorhidrato estándar y llevar a fiola de 100 mL. Proceder según técnica analítica.

b. Cálculo estadístico

b.1. Cálculo del porcentaje de recuperación de cada concentración

La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los intervalos de confianza.

$$\% R = \frac{\text{Cantidad encontrada}}{\text{Cantidad agregada}} \times 100$$

donde:

% R : Cantidad de analito (variable independiente).

Criterio de aceptación: 98% -102%

Resultados: Con los datos de las tablas 12 y 13 respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores:

- Norfloxacino : % R = 100,39960
- Fenazopiridina clorhidrato : % R = 100,08948

b.2. Cálculo de la desviación estándar (SD)

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

Resultados: Con los datos de las Tablas 12 y 13, se obtuvieron los siguientes valores:

- Norfloxacino : SD = 0,66358
- Fenazopiridina clorhidrato : SD = 0,30382

b.3. Cálculo de la desviación estándar relativa (RSD)

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

Criterio de Aceptación: $RSD \leq 2 \%$

Resultados: Con los datos de las Tablas 12 y 13, se obtuvieron los siguientes valores:

- Norfloxacino : $RSD = 0,66094$
- Fenazopiridina clorhidrato : $RSD = 0,30355$

b.4. Test de “t” de student

Suele efectuarse un test de “t” student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. Permite saber si la exactitud es aceptable. ⁽²¹⁾

Fórmula para hallar

t experimental (t_{exp}):

$$t_{exp} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{RSD}$$

donde:

R : Porcentaje de recuperación.

n : Número de determinaciones ($n = 9$).

Siendo $t_{\text{tabla}} = 2,306$; para $9 - 1 = 8$ grados de libertad; y $p = 0,05$

Criterio de Aceptación: Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$, no existe diferencia significativa entre la recuperación media, confirmándose así la buena exactitud del método.

Resultados: Con los datos de las tablas 12 y 13 respectivamente, se obtuvieron los siguientes valores:

- Norfloxacino : $t_{\text{exp}} = 1,81377$
- Fenazopiridina clorhidrato : $t_{\text{exp}} = 0,88438$

Por tanto, no existe diferencia significativa entre la recuperación del método para ambos principios activos.

ESTÁNDAR: NORFLOXACINO

Potencia tal cual:

100,37%

STD (%)	STD 100% (AREAS)		
Nº estándar	1	2	3
Respuesta	3 433,29663	3 392,04395	3 399,77612
Respuesta	3 424,36816	3 382,84985	3 395,21460
Respuesta	3 423,19678	3 386,84351	3 412,77417
PROMEDIO	3 426,95386	3 387,07910	3 402,58830
SD	5,5241	4,8513	9,1113
RSD	0,16120	0,14323	0,26778
AREASTD (PROMEDIO)			3 405,54042
RSD			0,53928

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Norfloxacino	50,1
	49,99
	50,04
FACTOR STD	16,07312
RSD	0,11006

MUESTRA	PESO (mg)	CANTIDAD AGREGADA (mg)	ÁREA MP	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERAC.
M1 - 80%	320,16	321,34459	2 744,30485	323,8072	100,76633
M2 - 80%	320,02	321,20407	2 696,93270	318,2176	99,07023
M3 - 80%	320,02	321,20407	2 717,91911	320,6938	99,84115
M1 -100%	400,15	401,63056	3 407,97111	402,1148	100,12056
M2 - 100%	399,95	401,42982	3 415,07088	402,9525	100,37931
M3 - 100%	400,09	401,57033	3 430,82739	404,8116	100,80715
M1 - 120%	480,17	481,94663	4 137,91553	488,2427	101,30638
M2 - 120%	479,93	481,70574	4 099,39177	483,6971	100,41341
M3 - 120%	480,06	481,83622	4 120,04085	486,1336	100,89187
PROMEDIO					100,39960
SD					0,66358
RSD					0,66094

Para (n – 1) = 9 - 1 grados de libertad y p = 0,05:

t_{tabla} = 2,30600
t_{exp} = 1,81377

Tabla 12. Exactitud: Norfloxacino

ESTÁNDAR: FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO

Potencia tal cual:

99,19%

STD (%)	STD 100% (AREAS)		
Nº estándar	1	2	3
Respuesta	427,31445	423,65201	424,33047
Respuesta	426,31909	423,52167	423,75420
Respuesta	426,34610	423,63058	426,96716
PROMEDIO	426,65988	423,60142	425,01728
SD	0,5670	0,0699	1,7131
RSD	0,13290	0,01650	0,40306
AREASTD (PROMEDIO)			425,09286
RSD			0,37730

STD (%)	PESO (mg)
STD 100	78
Fenazopiridina	78,01
Clorhidrato	78
FACTOR STD	1,98071
RSD	0,00740

MUESTRA	PESO (mg)	CANTIDAD AGREGADA (mg)	ÁREA MP	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERAC.
M1 - 80%	40,12	39,79503	343,40418	40,0021	100,52035
M2 - 80%	40,15	39,82479	342,78908	39,9304	100,26532
M3 - 80%	39,97	39,64624	340,81878	39,7009	100,13795
M1 -100%	50,13	49,72395	426,91120	49,7296	100,01132
M2 - 100%	50,04	49,63468	425,24692	49,5357	99,80061
M3 - 100%	50	49,59500	428,03859	49,8609	100,53615
M1 - 120%	60,07	59,58343	511,55990	59,5900	100,01110
M2 - 120%	59,91	59,42473	508,58239	59,2432	99,69453
M3 - 120%	60,07	59,58343	510,62355	59,4810	99,82804
PROMEDIO					100,08948
SD					0,30382
RSD					0,30355

Para (n – 1) = 9 - 1 grados de libertad y p = 0,05:

t_{tabla} = 2,30600

t_{exp} = 0,88438

Tabla 13. Exactitud: Fenazopiridina Clorhidrato

5.3.4. Precisión

5.3.4.1. Precisión del sistema

La precisión se expresa matemáticamente calculando la dispersión de los datos respecto a la media.

a. Método Operatorio

Preparar el estándar al 100% tal como indica la técnica analítica.

Injectar en el sistema por siete veces.

b. Cálculo estadístico

b.1. Cálculo de la desviación estándar (SD)

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

Resultados: Ver tabla 14.

- Norfloxacino : SD = 19,29285
- Fenazopiridina clorhidrato : SD = 2,85176

b.2. Cálculo de la desviación estándar relativa (RSD)

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

Criterio de aceptación: $RSD \leq 2\%$

Resultados: Ver Tabla 14.

- Norfloxacino : RSD = 0,54769

- Fenazopiridina clorhidrato : RSD = 0,65401

Nº INYECCION	NORFLOXACINO		FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO	
	ÁREAS	TIEMPOS	ÁREAS	TIEMPOS
1	3 513,40576	2,53084	435,75842	10,80722
2	3 496,93384	2,5308	432,33652	10,84684
3	3 507,08813	2,53696	434,95956	10,85546
4	3 551,62915	2,54238	437,32120	10,84745
5	3 528,69824	2,53082	434,73434	10,80911
6	3 519,04321	2,53006	435,62598	10,81723
7	3 541,49048	2,53032	441,54593	10,82758
PROMEDIO	3 522,61269	2,53317	436,04028	10,83013
SD	19,29285	0,00472	2,85176	0,01983
RSD	0,54769	0,18624	0,65401	0,18314

Tabla 14. Precisión del Sistema

5.3.4.2. Repetibilidad

a. Método Operatorio

Efectuar análisis empleando estándares de referencia en la concentración de 100% preparados como indica la técnica analítica.

Realizar 6 determinaciones sobre una muestra homogénea, preparada siguiendo la técnica analítica. Ver Gráficas 5 y 6 (Repetibilidad de Norfloxacinó y Fenazopiridina Clorhidrato respectivamente).

b. Cálculo estadístico

b.1. Cálculo de la desviación estándar relativa (RSD)

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

Criterio de aceptación: $RSD \leq 2\%$

Resultados: Con los datos de las tablas 15 y 16 (Repetibilidad de Norfloxacino y Fenazopiridina Clorhidrato respectivamente), se obtuvieron los siguientes valores:

- Norfloxacino : $RSD = 1,0896$
- Fenazopiridina clorhidrato : $RSD = 1,2405$

Tabla 15. Repetibilidad: Norfloxacinó

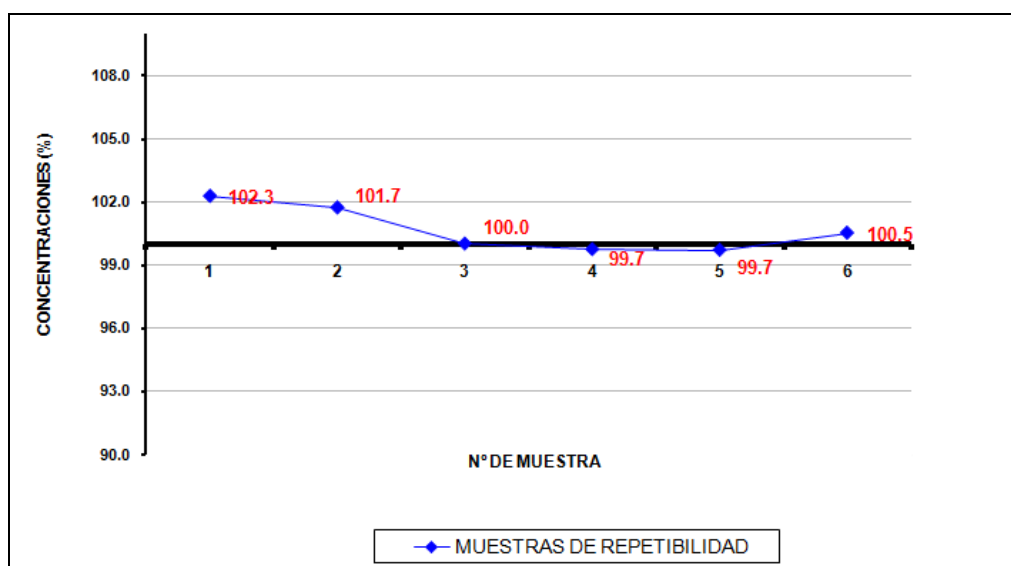
ESTÁNDAR/Potencia tal cual: 100,37%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	3 436,29883	3 392,04395
Respuesta	3 448,20410	3 382,34985
Respuesta	3 433,29663	3 485,09961
Respuesta	3 424,36816	-----
Respuesta	3 423,19678	-----
PROMEDIO	3 433,07290	3 419,83114
SD	9,0854	56,7316
RSD	0,22925	1,65890
ÁREA STD (PROMEDIO)		3 428,10724
RSD		0,93414

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Norfloxacinó	50,1
	49,99
FACTOR STD	0,04018
RSD	0,15542

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacinó 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% NORFLOXACINO	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	564,34	3 491,13025	2 499,5969	102,2907	409,16288
MUESTRA 2	564,22	3 471,52429	2 500,1285	101,7379	406,95158
MUESTRA 3	564,11	3 411,81580	2 500,6160	100,0076	400,03020
MUESTRA 4	564,12	3 402,79602	2 500,5717	99,7414	398,96557
MUESTRA 5	564,09	3 401,44275	2 500,7047	99,7070	398,82812
MUESTRA 6	564,41	3 431,39014	2 499,2869	100,5279	402,11142
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	564,249 mg	PROMEDIO		100,6687	402,67496
		SD		1,0969	4,3875
		RSD		1,0896	1,0896



Gráfica 5. Repetibilidad: Norfloxacinó

Tabla 16. Repetibilidad: Fenazopiridina Clorhidrato

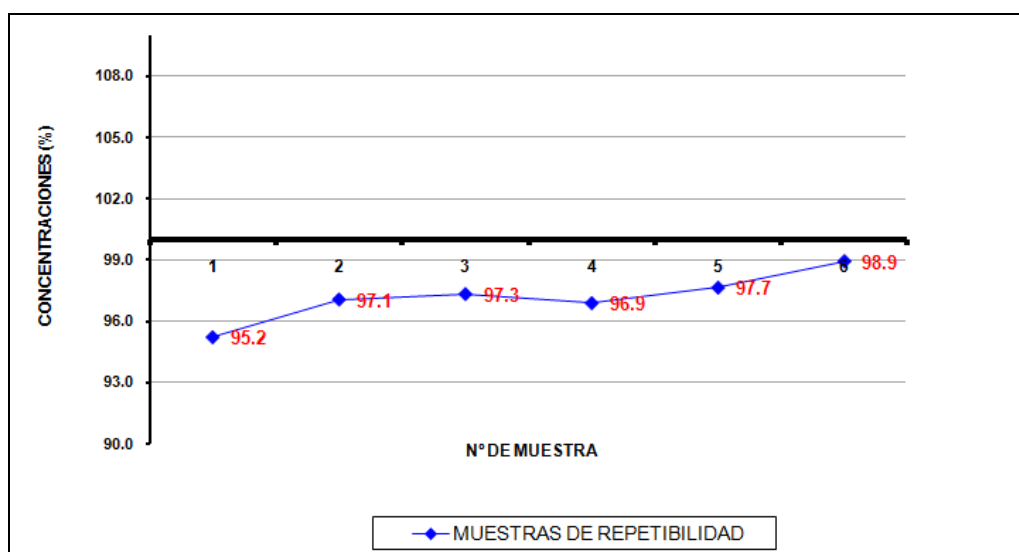
ESTÁNDAR/Potencia tal cual: 99,19%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	431,21133	423,65201
Respuesta	430,61819	423,52167
Respuesta	427,31445	427,46796
Respuesta	426,31909	-----
Respuesta	426,3610	-----
PROMEDIO	428,36183	424,88055
SD	2,0997	2,2417
RSD	0,48862	0,52761
AREA STD (PROMEDIO)		427,05635
RSD		0,6583

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Fenazopiridina HCl	78
	78,01
FACTOR STD	0,03962
RSD	0,00906

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacin 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% FENAZOPIRID. CLORHIDRATO	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	564,34	410,68225	2 499,5969	95,2250	47,61250
MUESTRA 2	564,22	418,55373	2 500,1285	97,0708	48,53541
MUESTRA 3	564,11	419,62677	2 500,6160	97,3386	48,66932
MUESTRA 4	564,12	417,71415	2 500,5717	96,8933	48,44663
MUESTRA 5	564,09	420,95581	2 500,7047	97,6504	48,82520
MUESTRA 6	564,41	426,76596	2 499,2869	98,9421	49,47103
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	564,249 mg	PROMEDIO		97,1867	48,59335
		SD		1,2056	0,6028
		RSD		1,2405	1,2405



Gráfica 6. Repetibilidad: Fenazopiridina Clorhidrato

5.3.4.3. Precisión Intermedia

a. Método Operatorio

Dos analistas deben realizar el ensayo, en diferentes equipos, en días diferentes. Se deben hacer 7 inyecciones de solución estándar al 100 % preparada según técnica analítica.

La preparación de la muestra debe realizarse según lo indicado por la técnica analítica. Cada analista debe preparar seis muestras en total. Inyectar por duplicado cada solución preparada (ver gráficas 7 y 8).

b. Cálculo estadístico

b.1. Cálculo de la desviación estándar relativa (RSD)

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

**ESTÁNDAR/Potencia tal cual: 100,37 %
NORFLOXACINO**

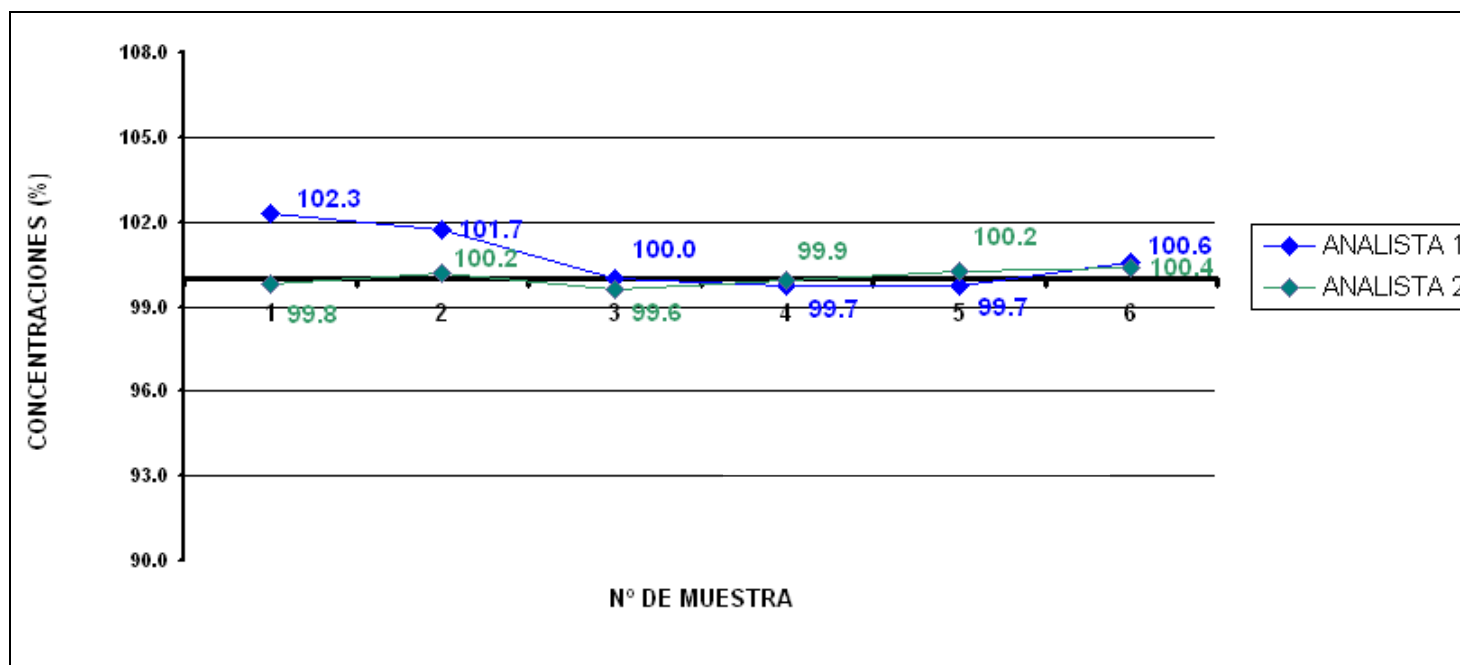
STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	ANALISTA 1	ANALISTA 2
Respuesta	3 436,29883	1 952,0875
Respuesta	3 448,20410	1 961,23022
Respuesta	3 433,29663	1 958,90527
Respuesta	3 424,36816	1 960,31531
Respuesta	3 423,19678	1 967,13513
Respuesta	3 392,04395	1 905,05212
Respuesta	3 382,34985	1 909,11877
Respuesta	3 485,09961	1 983,97070
PROMEDIO	3 428,10724	1 949,72828
SD	32,02329	27,91530
RSD	1,65890	1,43175

	PESO (mg)	
STD (%)	ANALISTA 1	ANALISTA 2
STD 100 Norfloxacinó	50,1	52,52
	49,99	52,4
FACTOR STD	0,04018	0,04212
RSD	0,15542	0,16175

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacinó 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)		ÁREA MP		Contenido por dosis (mg/cap.)	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2
MUESTRA 1	564,34	561,17	3 491,13025	1 862,90894	409,16288	399,09054
MUESTRA 2	564,22	561,01	3 471,52429	1 870,09052	406,95158	400,74331
MUESTRA 3	564,11	560,40	3 411,81580	1 857,34845	400,03020	398,44604
MUESTRA 4	564,12	560,42	3 402,79602	1 862,95520	398,96557	399,63456
MUESTRA 5	564,09	559,26	3 401,44275	1 865,35785	399,82812	400,97995
MUESTRA 6	564,41	559,39	3 431,39014	1 868,20966	402,11142	401,49965
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	564,249 mg	556,45 mg	PROMEDIO		402,67496	400,06567
			SD		4,3875	1,1926
			RSD		1,0896	0,2981
PROMEDIO ENTRE DOS ANALISTAS						401,37032
RSD ENTRE DOS ANALISTAS						0,45969

Tabla 17. Precisión Intermedia: Norfloxacinó



Gráfica 7. Precisión Intermedia: Norfloxacino

**ESTÁNDAR/Potencia tal cual: 99,19 %
FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO**

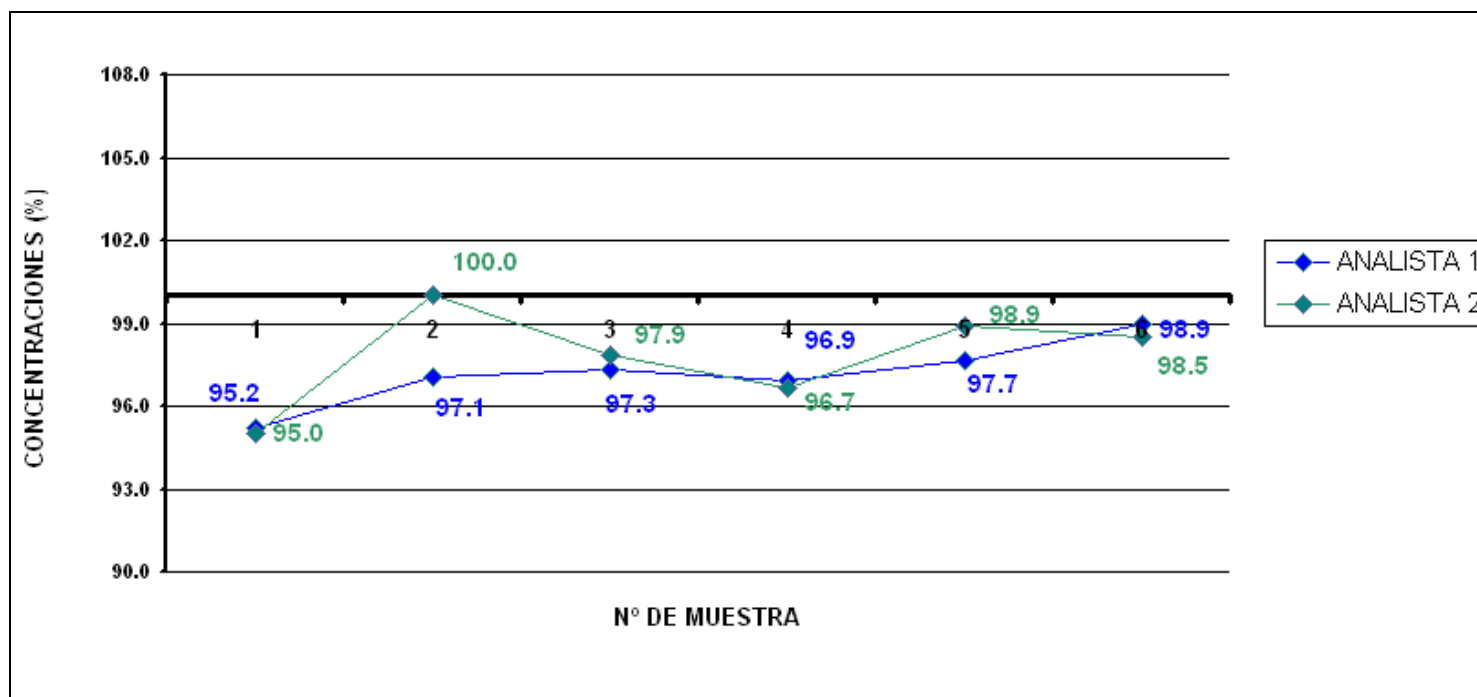
STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	ANALISTA 1	ANALISTA 2
Respuesta	431,21133	260,40512
Respuesta	430,61819	260,21872
Respuesta	427,31445	260,91211
respuesta	426,31909	262,53424
respuesta	426,34610	262,14786
respuesta	423,65201	256,84814
respuesta	423,52167	257,29532
respuesta	427,46796	263,21698
PROMEDIO	427,05635	260,44731
SD	2,8112	2,33230
RSD	0,6583	0,89550

	PESO (mg)	
STD (%)	ANALISTA 1	ANALISTA 2
STD 100 Fenazopiridina clorhidrato	78,00	81,87
	78,01	81,39
FACTOR STD	0,03962	0,04146
RSD	0,00906	0,41579

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacin 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)		ÁREA MP		Contenido por dosis (mg/cap.)	
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ANALISTA 1	ANALISTA 2
MUESTRA 1	564,34	561,17	410,68225	246,95999	47,61250	48,72323
MUESTRA 2	564,22	561,01	418,55373	246,64950	48,53541	48,67585
MUESTRA 3	564,11	560,40	419,62677	247,64244	48,66932	48,92500
MUESTRA 4	564,12	560,42	417,71415	244,62480	48,44663	48,32710
MUESTRA 5	564,09	559,26	420,95581	249,87106	48,82520	49,46592
MUESTRA 6	564,41	559,39	426,76596	248,86900	49,47103	49,25610
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	564,249 mg	556,45 mg	PROMEDIO		48,59335	48,89554
			SD		0,6028	0,4141
			RSD		1,2405	0,8469
PROMEDIO ENTRE DOS ANALISTAS						48,74444
RSD ENTRE DOS ANALISTAS						0,43837

Tabla 18. Precisión Intermedia: Fenazopiridina Clorhidrato



Gráfica 8. Precisión Intermedia Fenazopiridina Clorhidrato

5.3.5 Robustez

a. Método Operatorio

Trabajar con las mismas muestras del estudio de repetibilidad. Realizar la preparación del estándar y la muestra según lo indicado en la técnica analítica.

Injectar por duplicado cada solución preparada.

Para el estudio de robustez los cambios de condiciones son las siguientes:

- Muestra protegida de la luz
- Cambio de flujo (trabajar a un flujo de 0,5 mL / min)
- Variación de la temperatura de la columna (trabajar con el horno apagado)
- Cambio de columna (trabajar con una columna LiChrospher 60 RP-select B 250 x 4 mm)

b. Cálculo estadístico

b.1. Cálculo de la desviación estándar relativa (RSD.

Calcular de la misma manera que en el punto 5.2.4.1.

Criterio de aceptación: $RSD \leq 2\%$

Resultados: Ver resultados en tablas 19 y 20 (muestra protegida de la luz); 21 y 22 (cambio de flujo); 23 y 24 (horno apagado); 25 y 26 (cambio de columna) respectivamente.

ESTÁNDAR NORFLOXACINO / Potencia tal cual: 100,37%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
respuesta	3 576,19507	3 561,23804
respuesta	3 603,31494	3 559,19971
respuesta	3 606,76611	3 569,57861
respuesta	3 603,06030	-----
respuesta	3 600,26416	-----
PROMEDIO	3 597,92012	3 563,33879
SD	11,0567	5,4991
RSD	0,46568	0,15432
ÁREA STD (PROMEDIO)		3 584,95212
RSD		0,56913

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Norfloxacino	50,12
	49,92
FACTOR STD	0,04016
RSD	0,28273

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacino 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)		ÁREA MP		Contenido por dosis (mg/cap.)	
	ANALISIS NORMAL	PROTEGIDO DE LUZ	ANALISIS NORMAL	PROTEGIDO DE LUZ	ANALISIS NORMAL	PROTEGIDO DE LUZ
MUESTRA 1	563,12	563,24	3 513,31104	3 540,66297	393,60029	396,58005
MUESTRA 2	563,17	563,24	3 552,62598	3 534,32080	397,96946	395,86968
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO			395,78487	396,22487
		SD			3,08947	0,50231
		RSD			0,78059	0,12677
PROMEDIO ENTRE DOS TIPOS DE MUESTRA						396,00487
RSD ENTRE DOS TIPOS DE MUESTRA						0,07856

Tabla 19. Muestra protegida de Luz: Norfloxacino

ESTÁNDAR FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO / Potencia tal cual: 99,19%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
respuesta	437,46890	436,80975
respuesta	438,55719	437,57452
respuesta	439,54916	436,94855
respuesta	437,83484	-----
respuesta	439,78171	-----
PROMEDIO	438,63836	437,11094
SD	1,0405	0,4074
RSD	0,23727	0,09321
ÁREA STD (PROMEDIO)		438,06558
RSD		0,25686

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Fenazopiridina clorhidrato	77,9
	78,14
FACTOR STD	0,03962
RSD	0,21752

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacin 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)		ÁREA MP		Contenido por dosis (mg/cap.)	
	ANALISIS NORMAL	PROTEGIDO DE LUZ	ANALISIS NORMAL	PROTEGIDO DE LUZ	ANALISIS NORMAL	PROTEGIDO DE LUZ
MUESTRA 1	563,12	563,24	418,12051	431,62215	47,27165	48,78771
MUESTRA 2	563,17	563,24	429,05243	428,31368	48,50327	48,41374
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO			47,88746	48,60073
		SD			0,87089	0,26443
		RSD			1,81862	0,54410
PROMEDIO ENTRE DOS TIPOS DE MUESTRA						48,24409
RSD ENTRE DOS TIPOS DE MUESTRA						1,04542

Tabla 20. Muestra protegida de Luz: Fenazopiridina Clorhidrato

ESTÁNDAR NORFLOXACINO / Potencia tal cual: 100,37%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	5 643,65967	5 582,75049
Respuesta	5 657,16260	5 557,45117
Respuesta	5 660,37744	5 562,50439
Respuesta	5 675,87451	-----
Respuesta	5 670,71729	-----
PROMEDIO	5 661,55830	5 567,56868
SD	11,2242	13,3884
RSD	0,15690	0,24047
ÁREA STD (PROMEDIO)		5,62631
RSD		0,89001

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Norfloxacinó	50,12
	49,92
FACTOR STD	0,04016
RSD	0,28273

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacinó 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% NORFLOXACINO	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	563,12	5 472, 08643	2 499,9112	97,6543	390,61714
MUESTRA 2	563,17	5 548, 05738	2 499,6893	99,0013	396,00506
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO		98,3278	393,31110
		SD		0,9525	3,8098
		RSD		0,9687	0,9687

Tabla 21. Cambio de Flujo (0,5 mL/min): Norfloxacinó

ESTÁNDAR FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO / Potencia tal cual: 99,19%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	671,77814	667,93042
Respuesta	674,93488	665,88037
Respuesta	676,26440	672,99091
Respuesta	674,30878	-----
Respuesta	672,17896	-----
PROMEDIO	673,89303	668,93390
SD	2,3043	3,6599
RSD	0,34172	0,54713
ÁREA STD (PROMEDIO)		672,03336
RSD		0,52518

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Fenazopiridina clorhidrato	77,9
	78,14
FACTOR STD	0,03962
RSD	0,21752

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacin 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% FENAZOPIRIDINA	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	563,12	635,09683	2 499,9112	93,6090	46,80449
MUESTRA 2	563,17	655,18366	2 499,6893	96,5611	48,28053
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO		95,0850	47,54251
		SD		2,0874	1,0437
		RSD		2,1953	2,1953

Tabla 22. Cambio de Flujo (0,5 mL/min): Fenazopiridina Clorhidrato

ESTÁNDAR NORFLOXACINO / Potencia tal cual: 100,37%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	3 550,46723	3 572,64183
Respuesta	3 541,63920	3 577,37281
Respuesta	3 561,65730	3 560,16729
Respuesta	3 557,83120	-----
Respuesta	3 549,10896	-----
PROMEDIO	3 552,14078	3 570,06064
SD	7,0032	8,8884
RSD	0,28250	0,24897
ÁREA STD (PROMEDIO)		3 558,86073
RSD		0,33674

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Norfloxacinó	50,12
	49,92
FACTOR STD	0,04016
RSD	0,28273

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacinó 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% NORFLOXACINO	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	563,12	3 528,17352	2 499,9112	99,5408	398,16320
MUESTRA 2	563,17	3 524,87492	2 499,6893	99,4389	397,75563
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO		99,4899	397,95941
		SD		0,0720	0,2882
		RSD		0,0724	0,0724

Tabla 23. Horno Apagado: Norfloxacinó

ESTÁNDAR FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO / Potencia tal cual: 99,19%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	428,56271	431,94327
Respuesta	430,78213	434,81093
Respuesta	424,90846	435,35219
Respuesta	427,59201	-----
Respuesta	432,73944	-----
PROMEDIO	428,91695	434,03546
SD	2,9659	1,8320
RSD	0,69283	0,42208
AREA STD (PROMEDIO)		430,83639
RSD		0,84089

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Fenazopiridina clorhidrato	77,9
	78,14
FACTOR STD	0,03962
RSD	0,21752

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacin 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% FENAZOPIRIDINA	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	563,12	419,62326	2499,9112	96,4752	48,23758
MUESTRA 2	563,17	419,77178	2499,6893	96,5007	48,25037
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO		96,4880	48,24398
		SD		0,0181	0,0090
		RSD		0,0187	0,0187

Tabla 24. Horno Apagado: Fenazopiridina Clorhidrato

ESTÁNDAR NORFLOXACINO / Potencia tal cual: 100,37%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	3 489,36478	3 484,84323
Respuesta	3 472,43672	3 477,23434
Respuesta	3 477,68712	3 469,44382
Respuesta	3469,53021	-----
Respuesta	3 485,98736	-----
PROMEDIO	3 479,00124	3 477,17380
SD	7,6253	7,6999
RSD	0,24901	0,22144
ÁREA STD (PROMEDIO)		3 478,31595
RSD		0,22151

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Norfloxacinó	50,12
	49,92
FACTOR STD	0,04016
RSD	0,28273

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacinó 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% NORFLOXACINO	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	563,12	3 474,38932	2 499,9112	100,2932	401,17294
MUESTRA 2	563,17	3 524,87492	2 499,6893	101,7415	406,96616
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO		101,0174	404,06955
		SD		1,0241	4,0964
		RSD		1,0138	1,0138

Tabla 25. Cambio de Columna: Norfloxacinó

ESTÁNDAR FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO / Potencia tal cual: 99,19%

STD (%)	STD 100% (AREAS)	
Nº estándar	1	2
Respuesta	401,53432	399,98787
Respuesta	405,78834	402,78601
Respuesta	400,78542	397,13216
Respuesta	407,23134	-----
Respuesta	404,87601	-----
PROMEDIO	404,04309	399,96868
SD	2,6984	2,8270
RSD	0,67006	0,70680
ÁREA STD (PROMEDIO)		402,51518
RSD		0,82889

STD (%)	PESO (mg)
STD 100 Fenazopiridina clorhidrato	77,9
	78,14
FACTOR STD	0,03962
RSD	0,21752

MUESTRA: Cápsulas de gelatina dura, conteniendo Norfloxacin 400 mg y una tableta recubierta de fenazopiridina clorhidrato de 50 mg (Lote 0110547).

MUESTRA PROBLEMA	PESO (mg)	ÁREA MP	FACTOR MP	% FENAZOPIRIDINA	Contenido por dosis (mg/cap.)
MUESTRA 1	563,12	397,11845	2 499,9112	97,7251	48,86256
MUESTRA 2	563,17	398,66885	2 499,6893	98,0979	49,04897
PESO CONTENIDO/ CÁPSULA	563,1 mg	PROMEDIO		97,9115	48,95576
		SD		0,2636	0,1318
		RSD		0,2692	0,2692

Tabla 26. Cambio de Columna: Fenazopiridina Clorhidrato

VI. RESULTADOS

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE NORFLOXACINO		
TIPO DE VALIDACIÓN: PROSPECTIVA		
PARAMETROS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
SELECTIVIDAD		
Lectura del Estándar	Hay respuesta	Hay respuesta a 2,5 min
Lectura del placebo	No hay respuesta	Conforme
Lectura de la fase móvil	No hay respuesta	Conforme
Luz: Lectura placebo	No hay respuesta	Conforme
Lectura placebo + Estándar	Hay respuesta	Hay respuesta a 2,5 min
Calor: Lectura placebo	No hay respuesta	Conforme
Lectura placebo + Estándar	Hay respuesta	Hay respuesta a 2,5 min
LINEALIDAD		
LINEALIDAD DEL SISTEMA		
Coeficiente de correlación "r"	Mínimo 0,999	0,99903
Coeficiente de determinación "r ² "	Mínimo 0,99	0,99806
Test estadístico de r ² p=0,05 y n-2 grados de libertad	t _{regresión} > t _{tabla} t _{tabla} = 2,16	t _{regresión} = 81,68126
LINEALIDAD DEL METODO		
Coeficiente de correlación "r"	Mínimo 0,999	0,99966
Coeficiente de determinación "r ² "	Mínimo 0,99	0,99933
Test estadístico de r ² p=0,05 y n-2 grados de libertad	t _{regresión} > t _{tabla} t _{tabla} = 2,16	t _{regresión} = 102,06950
EXACTITUD		
Porcentaje de recuperación	98 % - 102%	100,3996 %
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	0,66094 %
PRECISION		
PRECISION DEL SISTEMA		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	0,18624 %
REPETIBILIDAD		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	1,0896 %
PRECISION INTERMEDIA		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	0,45969 %
ROBUSTEZ		
Desviación estándar relativa (RSD)		
- Protegido de la luz	Menor al 2 %	0,07856 %
- Temp. de columna (horno apagado)	Menor al 2 %	0,0724 %
- Cambio de columna	Menor al 2 %	1,0138 %

CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO		
TIPO DE VALIDACIÓN: PROSPECTIVA		
PARAMETROS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
SELECTIVIDAD		
Lectura del Estándar	Hay respuesta	Hay respuesta a 10,7 min
Lectura del placebo	No hay respuesta	Conforme
Lectura de la fase móvil	No hay respuesta	Conforme
Luz: Lectura placebo Lectura placebo + Estándar	No hay respuesta Hay respuesta	Conforme Hay respuesta a 10,7 min
Calor: Lectura placebo Lectura placebo + Estándar	No hay respuesta Hay respuesta	Conforme Hay respuesta a 10,7 min
LINEALIDAD		
LINEALIDAD DEL SISTEMA		
Coeficiente de correlación "r"	Mínimo 0,999	0,99928
Coeficiente de determinación "r ² "	Mínimo 0,99	0,99856
Test estadístico de r ² p=0,05 y n-2 grados de libertad	t _{regresión} > t _{tabla} t _{tabla} = 2,16	t _{regresión} = 95,09514
LINEALIDAD DEL METODO		
Coeficiente de correlación "r"	Mínimo 0,999	0,99991
Coeficiente de determinación "r ² "	Mínimo 0,99	0,99982
Test estadístico de r ² p=0,05 y n-2 grados de libertad	t _{regresión} > t _{tabla} t _{tabla} = 2,16	t _{regresión} = 196,10766
EXACTITUD		
Porcentaje de recuperación	98 % - 102 %	100,08948 %
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	0,30355 %
PRECISION		
PRECISION DEL SISTEMA		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	0,18314 %
REPETIBILIDAD		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	1,2405%
PRECISION INTERMEDIA		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor al 2 %	0,43837 %
ROBUSTEZ		
Desviación estándar relativa (RSD)		
- Protegido de la luz	Menor al 2 %	1,04542 %
- Temp. de columna (horno apagado)	Menor al 2 %	0,0187 %
- Cambio de columna	Menor al 2 %	0,2692 %

VII. DISCUSIONES

Selectividad

Se comprueba la selectividad del método al trabajar con el placebo y los principios activos puros bajo las condiciones establecidas. No se observa interferencia del placebo sobre la muestra, pues no hay respuesta del mismo al momento de realizar las lecturas.

Cabe anotar también que ambos principios activos pudieron ser elucidados en sus respectivos tiempos de retención a pesar de ser tratados bajo diferentes condiciones tales como luz y calor, por lo que su aplicación en este punto encuentra aceptabilidad. Los resultados de cuantificación de las muestras sometidas a hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación, se mostraron por debajo del contenido especificado; por lo que se indica tener precaución durante la preparación de la muestra frente a estas condiciones.

Linealidad

El método analítico responde linealmente a las concentraciones en las cuales se trabaja, tal como se observa en los gráficos presentados, para ambos principios activos.

En la linealidad del sistema las lecturas que se observan son proporcionales a las concentraciones con las cuales se trabajan los activos (50 %, 75%, 100 %, 125 %, 150 %).

Para el principio activo norfloxacino, la concentración al 100 % es de 0,16 mg/mL. Luego de la evaluación estadística, se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0,99903; siendo la especificación un mínimo de 0,999; y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99806; siendo la especificación un mínimo de 0,99; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “r”, donde el $t_{\text{regresión}} = 81,68126$ es mayor que $t_{\text{tabla}} = 2,16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

Para el principio activo fenazopiridina clorhidrato, la concentración al 100% es de 0,02 mg/mL. Luego de la evaluación estadística, se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0,99928; siendo la especificación un mínimo de 0,999; y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99856; siendo la especificación un mínimo de 0,99; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “r”, donde el $t_{\text{regresión}} = 95,09514$ es mayor que $t_{\text{tabla}} = 2,16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

En la linealidad del método se observan también lecturas proporcionales a las concentraciones de los analitos y la ecuación de la recta que se obtiene es muy similar a la obtenida para la linealidad del sistema, lo que nos demuestra que el método responde linealmente en el rango de trabajo empleado. Las lecturas que se observan son proporcionales a las concentraciones con las cuales se trabajan los activos (80 %, 100%, 120 %).

Para el principio activo norfloxacino, la concentración al 100 % es de 0,16 mg/mL. Luego de la evaluación estadística, se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0,99966; siendo la especificación un mínimo de 0,999; y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99933; siendo la especificación un mínimo de 0,99; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “r”, donde el $t_{\text{regresión}} = 102,06950$ es mayor que $t_{\text{tabla}} = 2,16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

Para el principio activo fenazopiridina clorhidrato, la concentración al 100% es de 0,02 mg/mL. Luego de la evaluación estadística, se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0,99991; siendo la especificación un mínimo de 0,999; y un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99982; siendo la especificación un mínimo de

0,99; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “r”, donde el $t_{\text{regresión}} = 196,10766$ es mayor que $t_{\text{tabla}} = 2,16$ con un intervalo de confianza de 95% y n-2 grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

Exactitud

Los resultados obtenidos son satisfactorios y están dentro de la especificación establecida; el porcentaje de recuperación es aceptable, así mismo, esto se verifica en las diferentes concentraciones trabajadas, en los cuales el porcentaje de recuperación del analito no presenta diferencias significativas entre ellas, por lo que se puede afirmar que a diferentes concentraciones se obtendrían porcentajes de recuperación similares.

Para el principio activo norfloxacin, el porcentaje de recuperación fue de 100,3996 %, siendo la especificación de 98 % - 102 %, el valor de la desviación estándar relativa es de 0,66094, siendo la especificación de un menor a 2 %. El test de t student sirve para confirmar si el valor obtenido no difiere significativamente de un grado de probabilidad ya establecido, siendo $t_{\text{exp}} = 1,81377$ menor que $t_{\text{tabla}} = 2,306$ con un intervalo de confianza de 95 % y n-1 grados de libertad.

Para el principio activo fenazopiridina clorhidrato, el porcentaje de recuperación fue de 100,089948 %, siendo la especificación de 98 % - 102 %, el valor de la desviación estándar relativa es de 0,30355, siendo la especificación de un menor a 2 %. El test de t student sirve para confirmar si el valor obtenido no difiere significativamente de un grado de probabilidad ya establecido, siendo $t_{\text{exp}} = 0,88438$ menor que $t_{\text{tabla}} = 2,306$ con un intervalo de confianza de 95 % y n-1 grados de libertad.

Precisión

En los análisis de precisión del sistema, repetibilidad y precisión intermedia se encuentra similitud en los resultados a través de los diversos ensayos realizados a las muestras, dando como resultado en todos los casos una desviación estándar relativa menor al 2 %, lo cual evidencia que la técnica analítica es precisa.

Robustez

La prueba de robustez de esta técnica analítica ha demostrado dar resultados reproducibles efectuando algunos cambios o ajustes en la metodología analítica propuesta (protección de la luz, temperatura de la columna y cambio de columna). Aun así, al apreciar los cromatogramas, se sugiere que si se efectuara algún cambio, este sea en la protección de la muestra de la luz. Cabe precisar también

que debe mantenerse siempre el flujo de 0,8 mL/min, pues su variación produce una RSD fuera de especificación.

VIII. CONCLUSIÓN

La técnica analítica desarrollada por cromatografía líquida de alta eficiencia para cuantificar norfloxacino y fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales demuestra ser efectiva, reproducible y confiable luego de evaluados los resultados de los parámetros de la validación. Esto garantiza que el producto cumple con las exigencias de calidad requeridos por el Organismo Regulador de Medicamentos.

IX. RECOMENDACIONES

1. Utilizar técnicas de análisis por HPLC debido a que los resultados obtenidos son más precisos, exactos, sensibles y presentan menores interferencias en comparación a otras técnicas analíticas que aún se siguen empleando.
2. Implementar el uso de la técnica analítica validada en esta monografía, para el análisis de formas farmacéuticas que contengan la asociación de norfloxacino y fenazopiridina clorhidrato, proporcionando de esta manera un manejo eficiente de tiempos de análisis y costos.
3. Poner mayor énfasis durante la etapa universitaria en el desarrollo de habilidades en el manejo de equipos automatizados de análisis, permitiendo de esta manera que los futuros profesionales químico farmacéuticos se conviertan en especialistas capacitados de alto nivel científico.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. United States Pharmacopeial Conv. Inc., United States Pharmacopeia 30 NF 25, Monografías Oficiales, 2007.
2. O'Neil MJ. (ed.) et al, The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 14ava edición. New Jersey: Merck & Co, 2006.
3. Litter M. Compendio de Farmacología. 4ta edición. Buenos Aires: El Ateneo, 1997.
4. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica, 8ava edición. México: El Manual Moderno, 2002.
5. Grushka E, Grinberg N. Advances in Chromatography, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
6. Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientists, New Jersey: Jhon Wiley & Sons Inc, 2006.
7. Kazakevich Y, LoBrutto, R. HPLC for Pharmaceutical Scientist, New jersey: Jhon Wiley & Sons Inc, 2007.
8. Heftmann E. (ed.) Chromatography 6th edition, Vol 69A, San Diego: Elsevier, 2004.
9. Katz E. (ed.) et al. Handbook of HPLC – Cromatographic Science Series, v. 78, New York: Marcel Dekker Inc, 1998.
10. Lough WJ, Wainer IW. High Performance Liquid Chromatography – Fundamental principles and practice, New York: Chapman & Hall, 1996.

11. Cazes J. (ed.), Ewing's Analytical Instrumentation Handbook 3th edition, New York: Marcel Dekker Inc., 2005.
12. FDA U.S. Food and Drug Administration [en línea]. Guideline on General Principles of Process Validation.
<<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124720.htm>> [Consulta: 24 agosto 2008].
13. Carleton F, Agalloco J. (ed.); Validation of pharmaceutical processes: Sterile products 2nd edition, New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.
14. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [en línea]. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1).
<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>> [Consulta: 16 noviembre 2008].
15. Huber L. Validation and Qualification in Analytical laboratories 2nd edition, New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2007.
16. Arias Ortiz A. Validación. Ponencia presentada en la Universidad de Valparaíso con auspicio de Laboratorio Bagó de Chile. Valparaíso, 2008.
17. Swadesh JK. HPLC Practical and Industrial Applications 2nd edition, Florida: CRC Press, 2001.

18. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Validación de Métodos Analíticos, Madrid: Gráficas Gispert S.A., 2001.
19. Calpena A. et al. Validación de métodos analíticos, Farmacia Clínica Vol.7 n° 9, Barcelona, 1990.
20. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México A.C., Guía de Validación de Métodos Analíticos, México D.F., 2002.
21. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Sección Catalana, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. Validación de Métodos Analíticos. Madrid; 1996.
22. Morales de la Cruz C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de material y de equipos utilizados para la validación.



A. Norfloxacin y fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales.



B. Balanza Analítica.



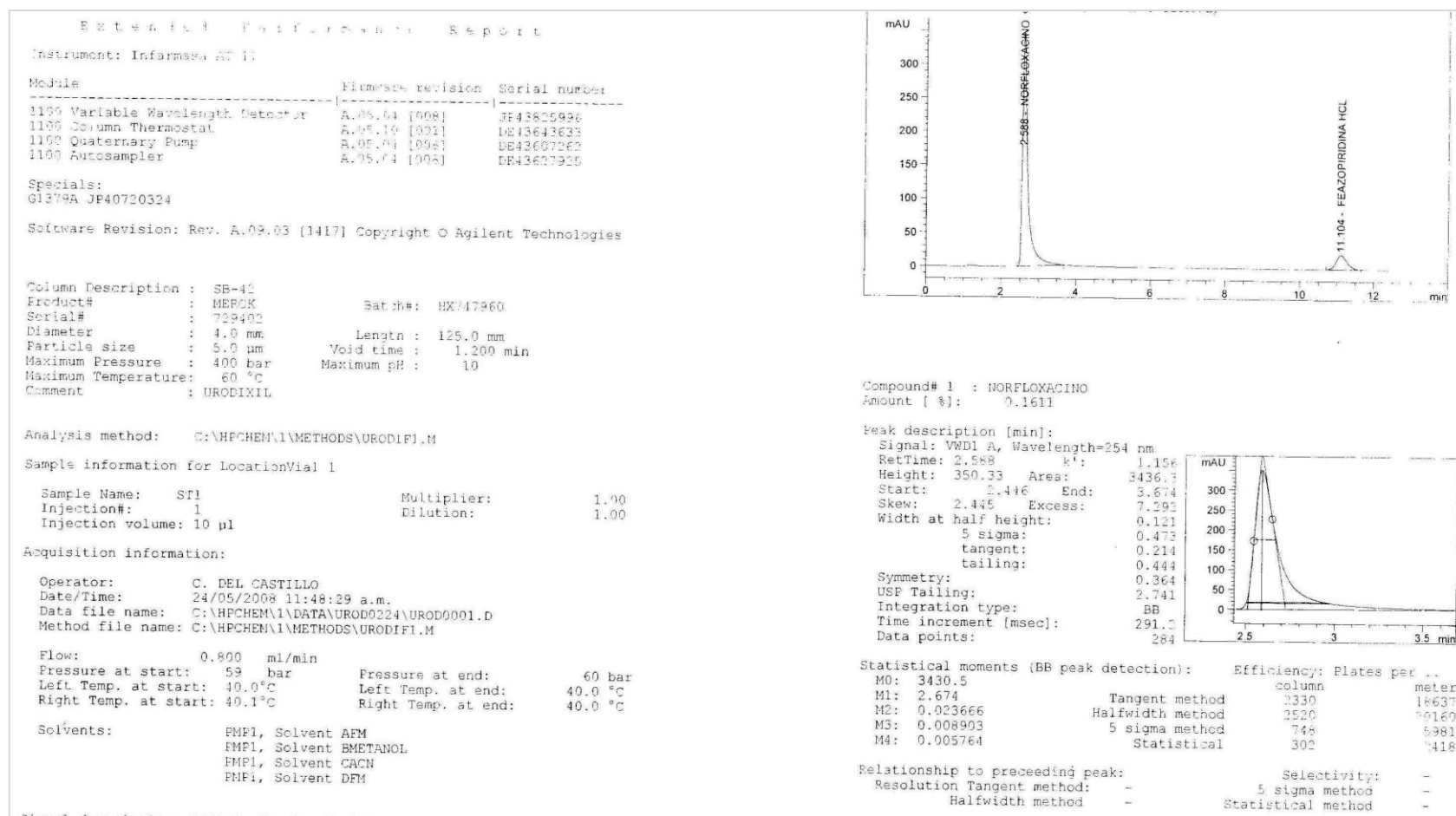
C. HPLC 1100 VWD.

Anexo 2. Tabla estadística de la distribución “t” de Student.

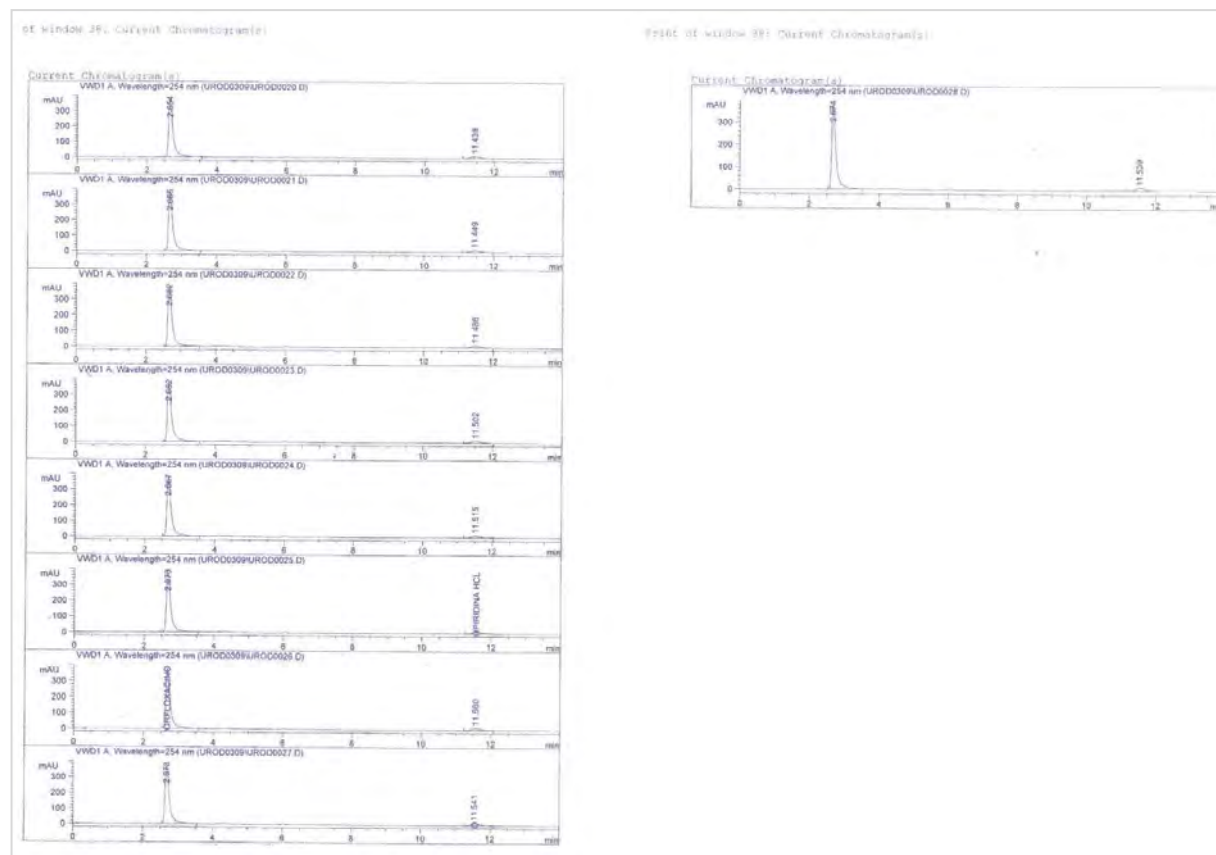
Tabla . Distribución de t de Student. Áreas de cola bilateral en función de los grados de libertad de la distribución.

v	α							
	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	636.578
2	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	31.600
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.869
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.689
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.660
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435
80	0.678	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
90	0.677	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183	3.402
100	0.677	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
∞	0.675	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.290

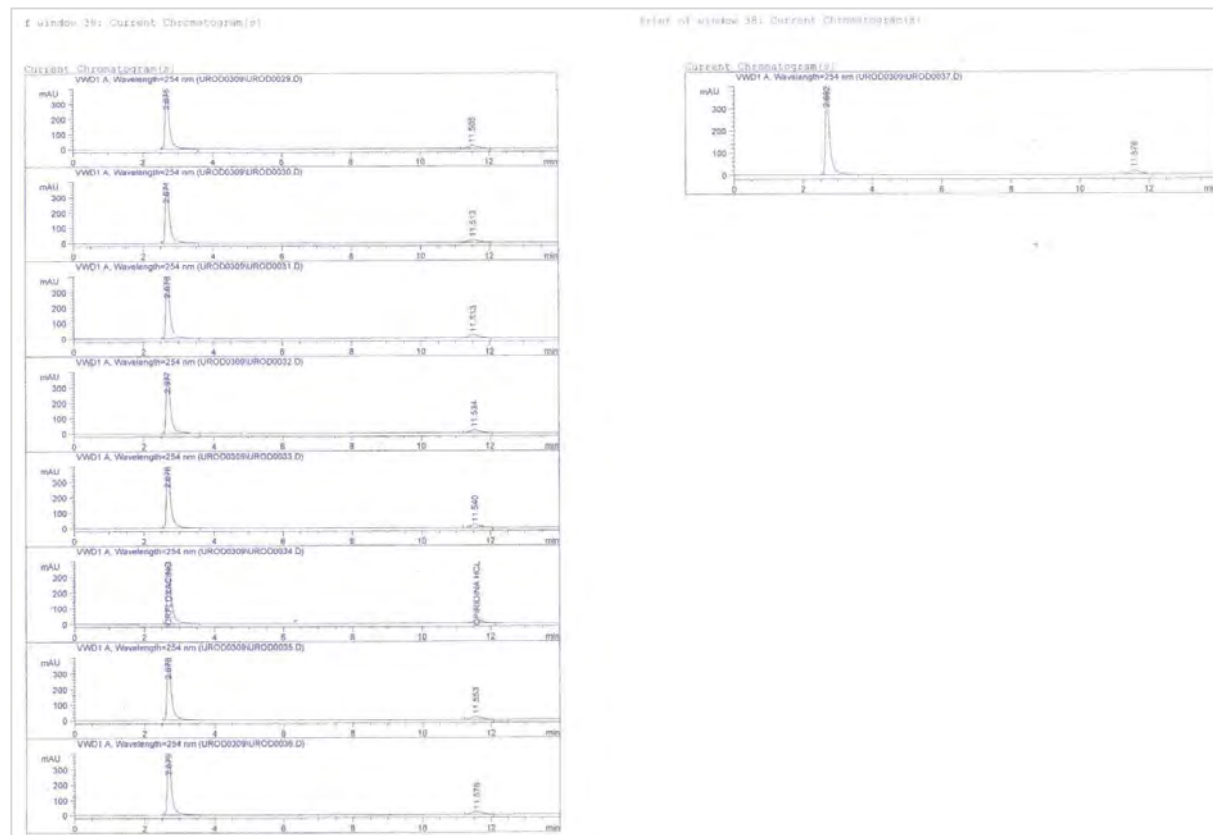
Anexo 3. Informe de Desempeño



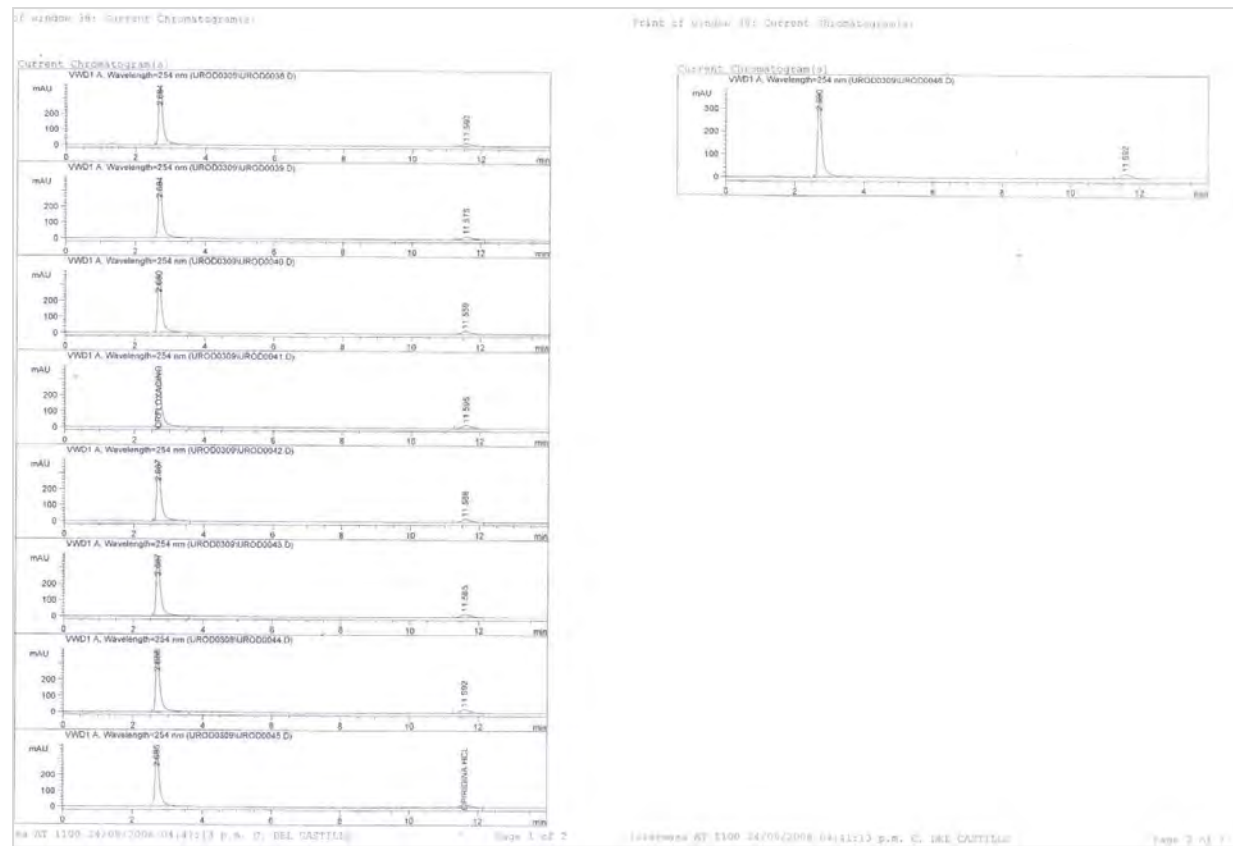
Anexo 4. Cromatogramas de Selectividad



A. Hidrólisis Ácida: Placebo + Estándar al 100 %



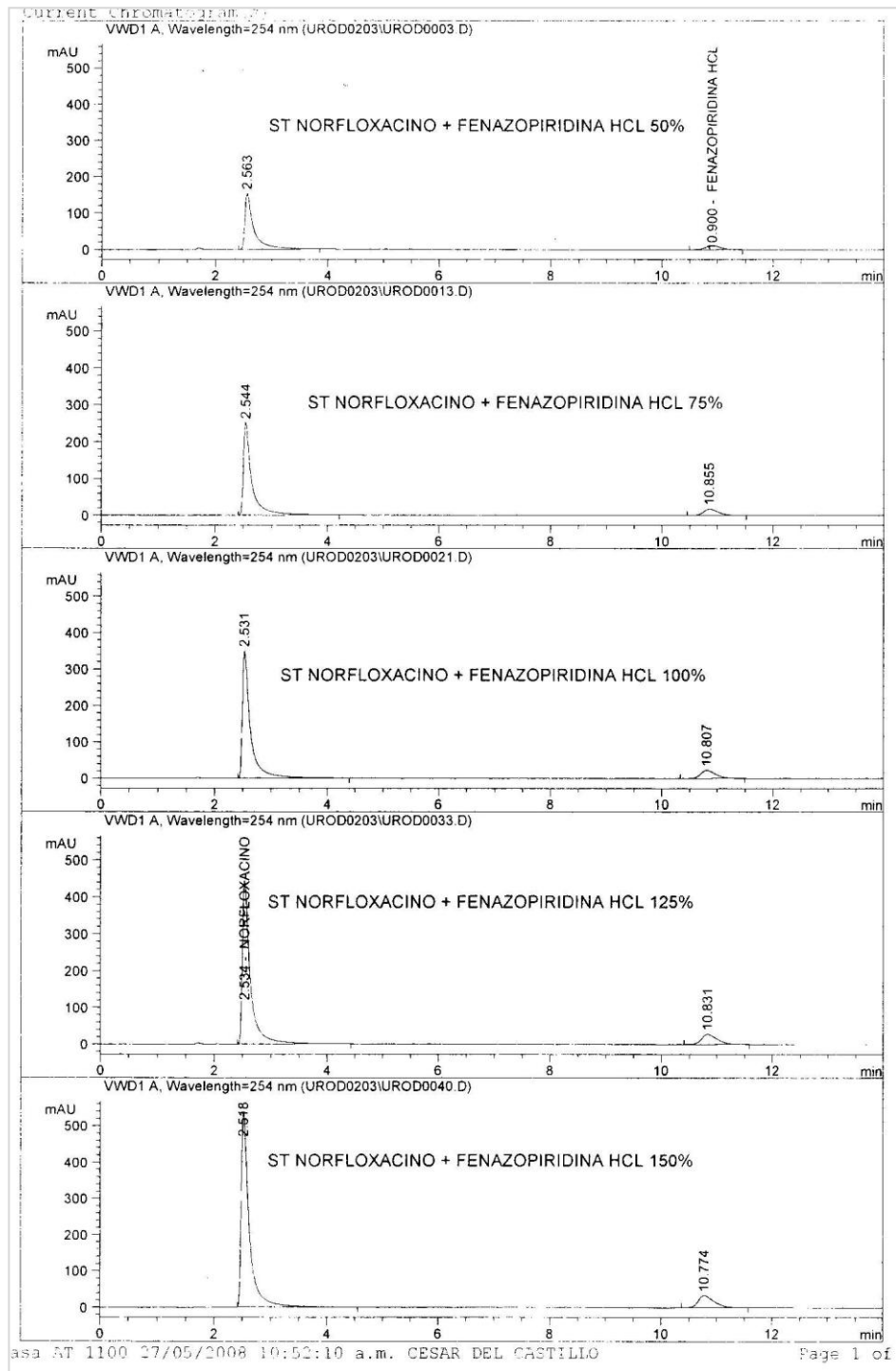
B. Hidrólisis Básica: Placebo + Estándar al 100 %



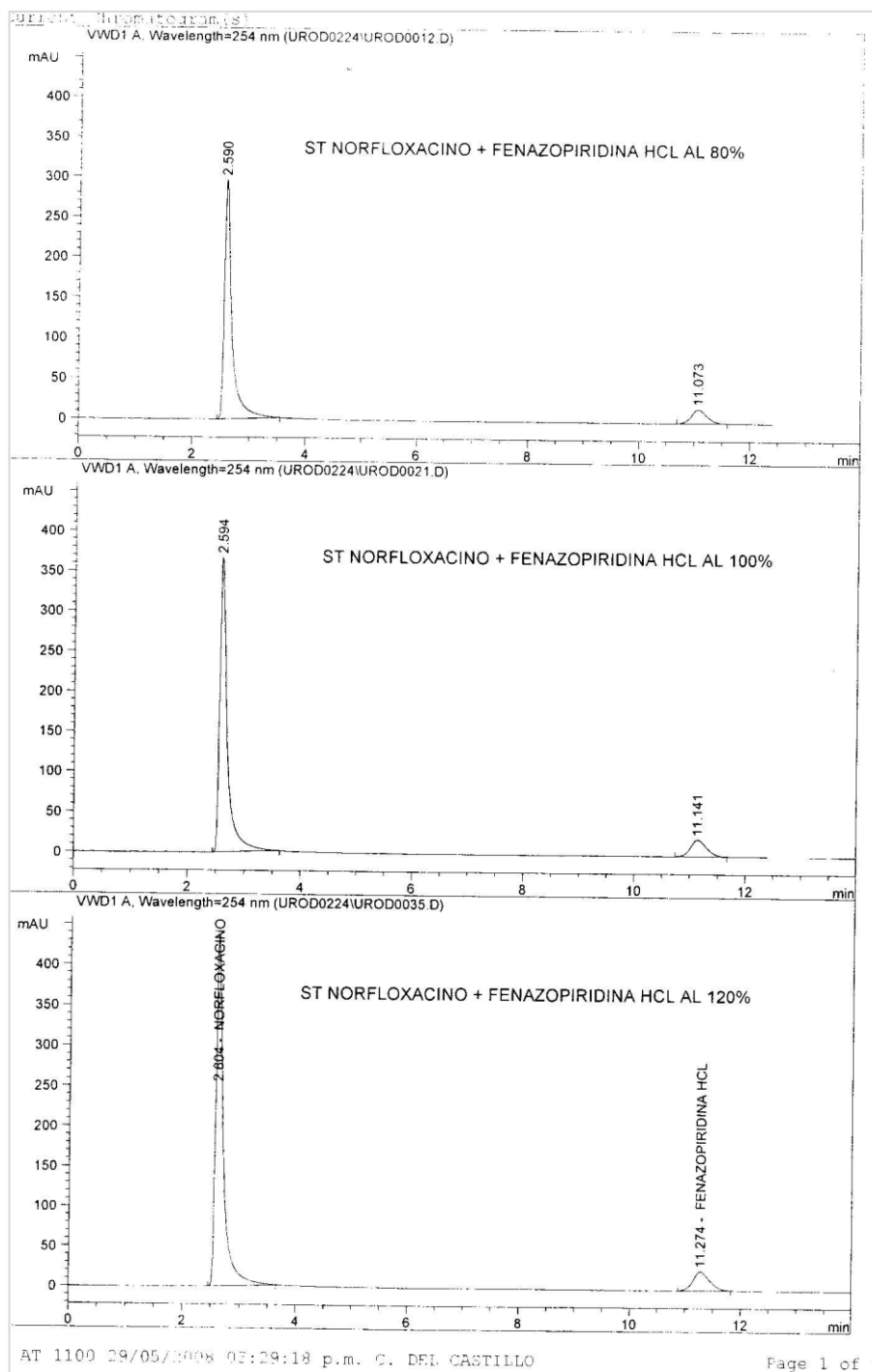
C. Oxidación: Placebo + Estándar al 100 %

Anexo 5. Cromatogramas de Linealidad

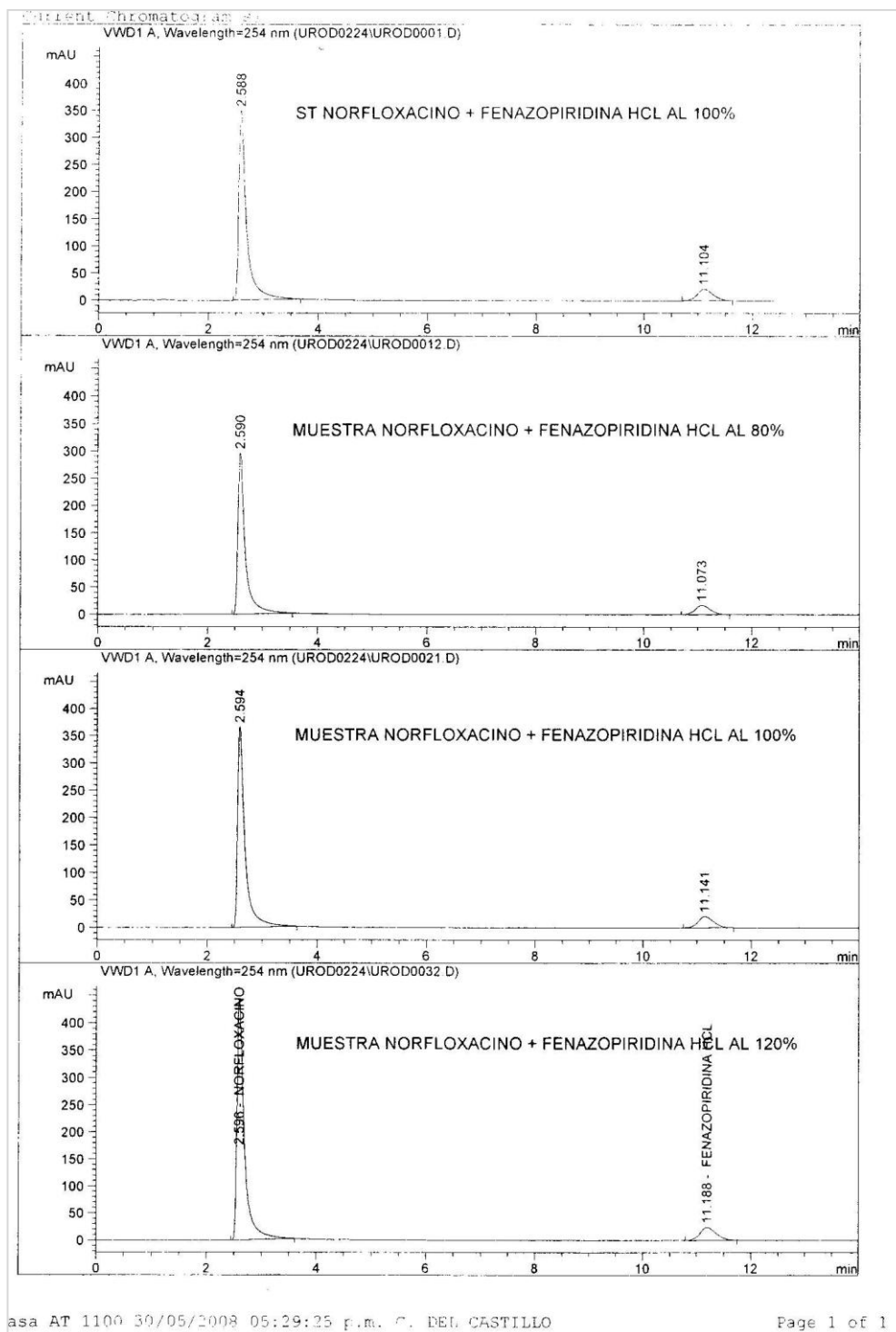
A. Linealidad del Sistema



B. Linealidad del Método

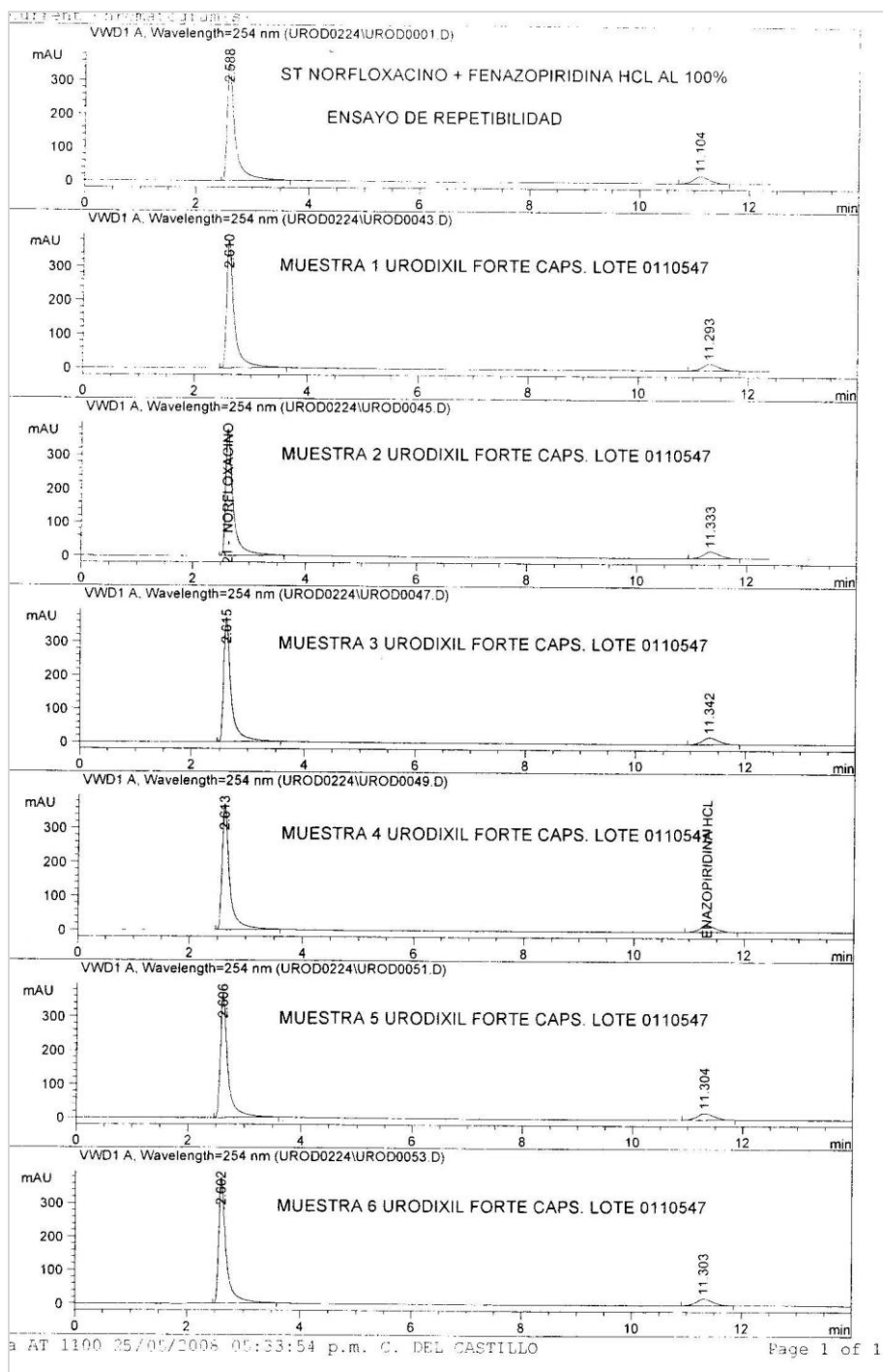


Anexo 6. Cromatogramas de Exactitud

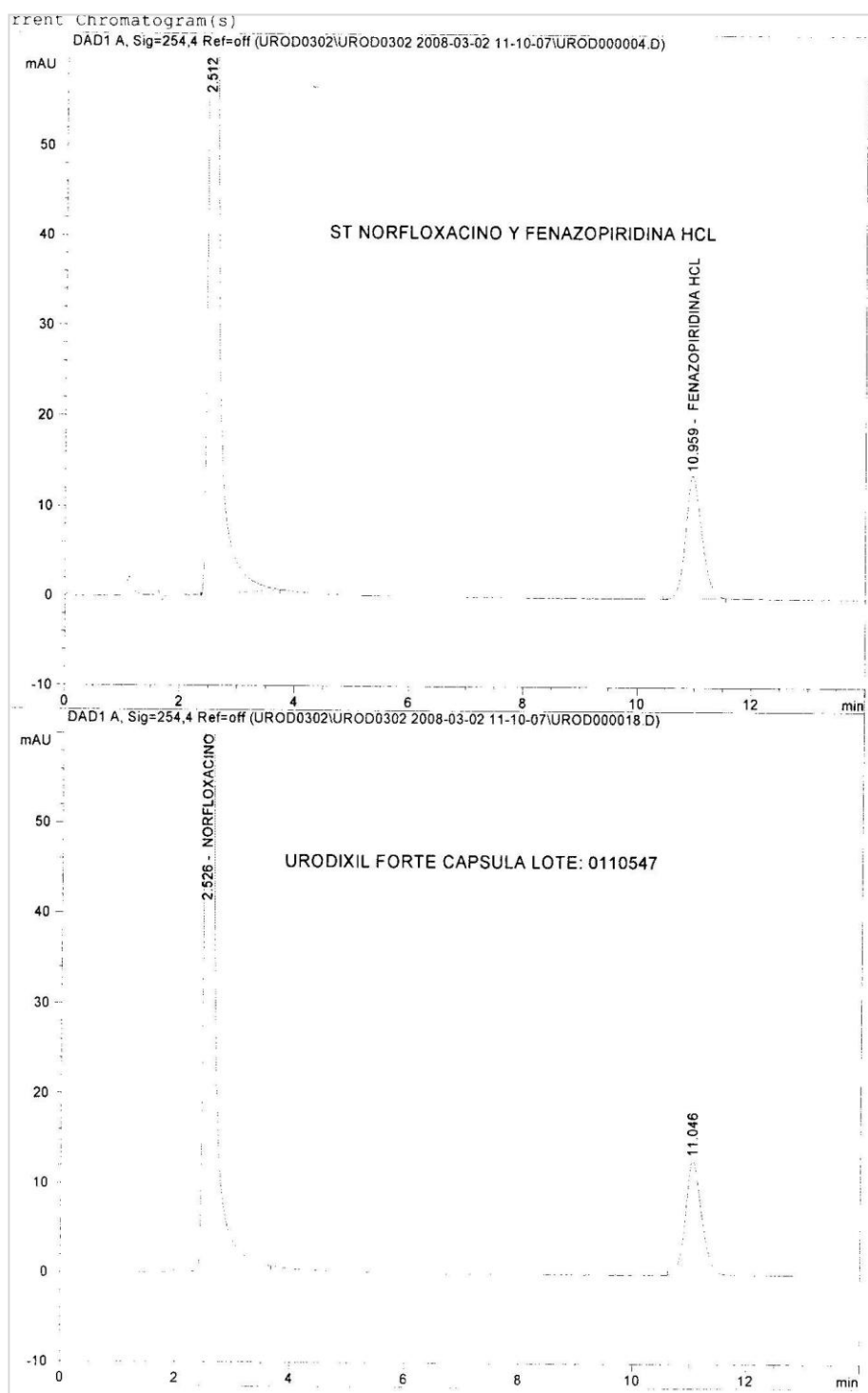


Anexo 7. Cromatogramas de Precisión

A. Repetibilidad

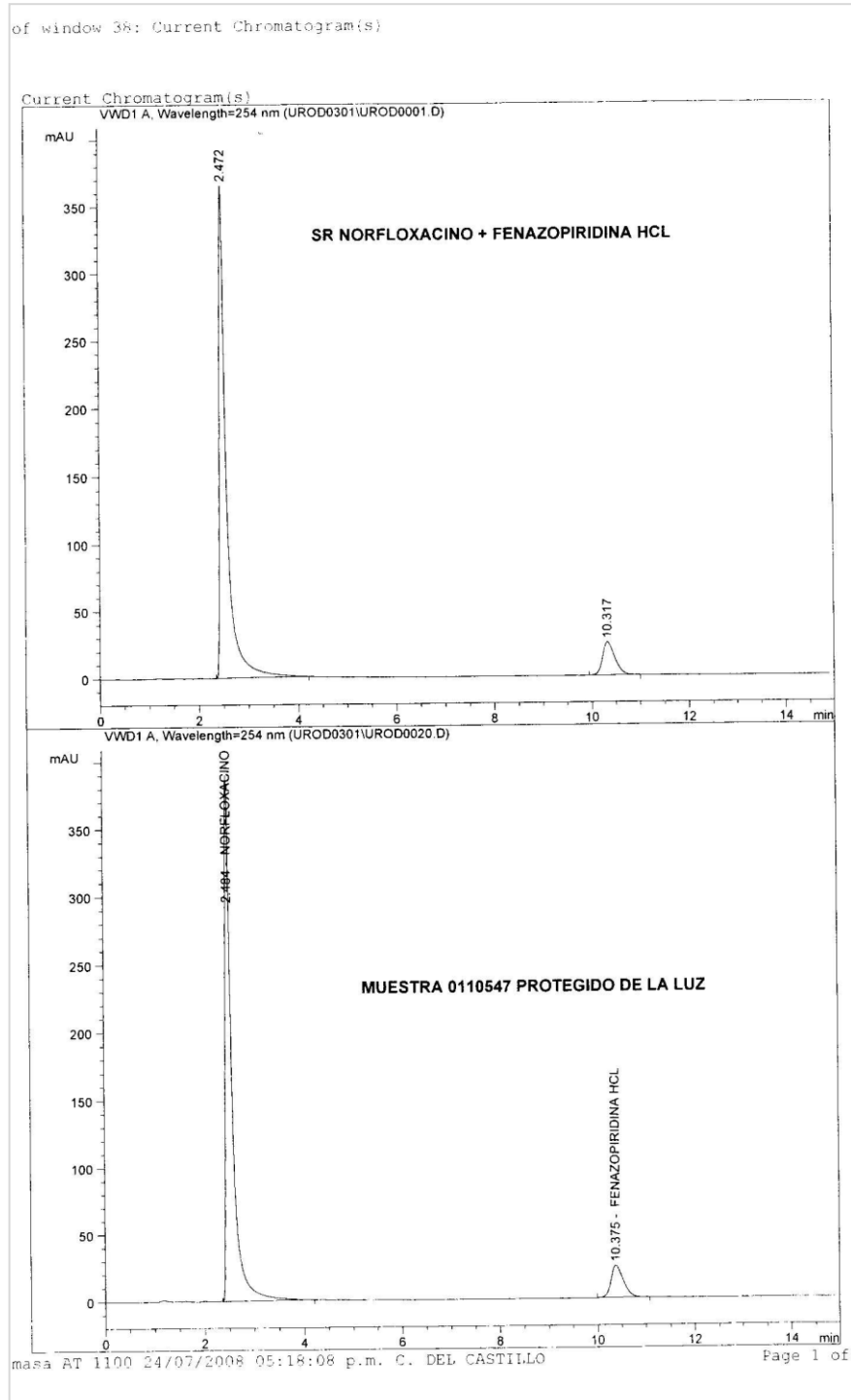


B. Precisión Intermedia

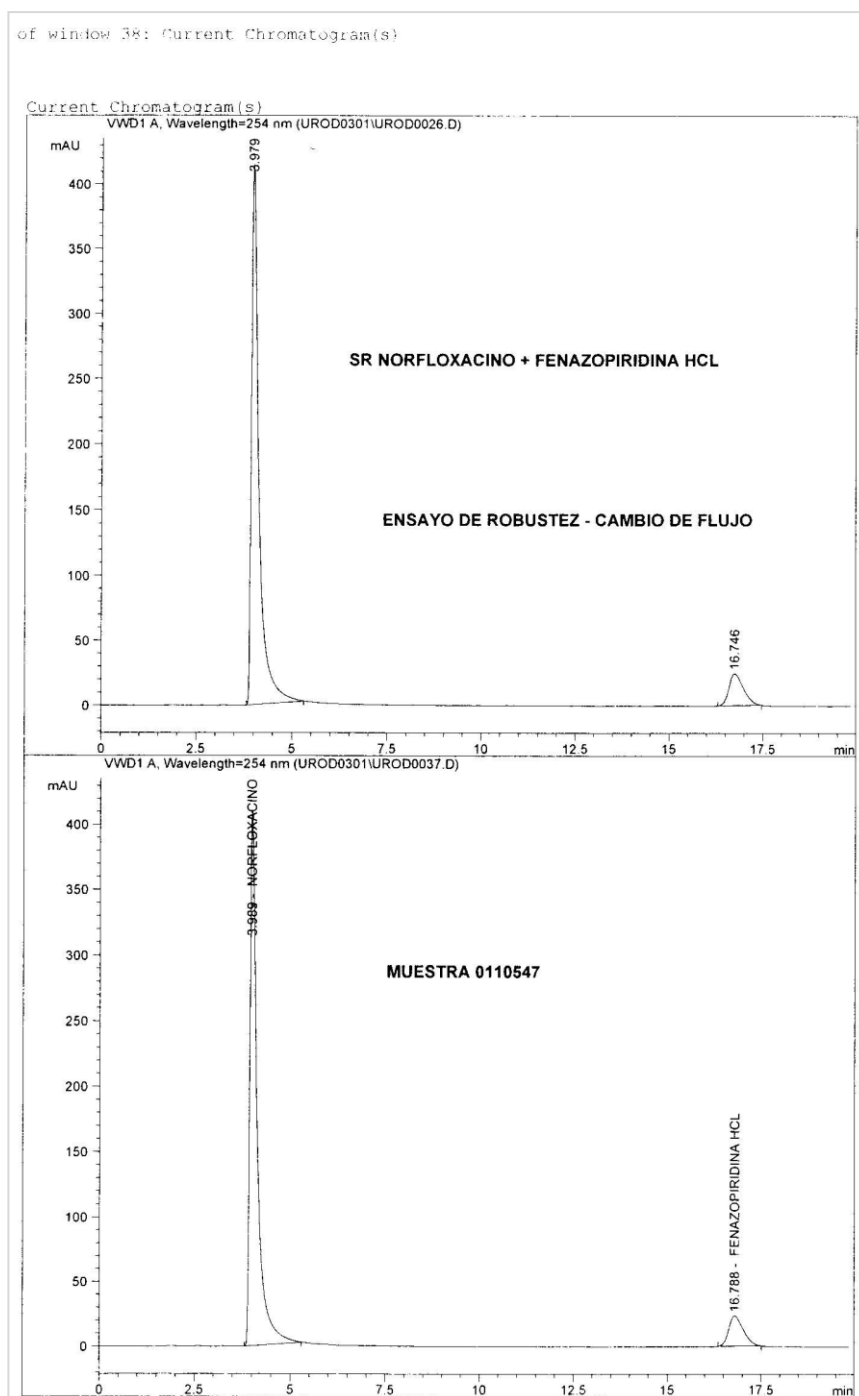


Anexo 8. Cromatogramas de Robustez

A. Muestra protegida de la Luz



B. Cambio de caudal de flujo.



Anexo 9. Tablas de Linealidad del Sistema

Tabla A. Equivalencias (Concentración del analito)

POTENCIA (%)	NORFLOXACINO STD.		FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO STD.	
	PESO (mg)	[] mg/mL	PESO (mg)	[] mg/mL
50	24,95	0,0801354	38,92	0,0098828
	25,14	0,0807457	38,92	0,0098828
	25,19	0,0809062	38,93	0,0098854
75	37,58	0,1207009	58,71	0,0149080
	37,64	0,1208937	58,5	0,0148547
	37,64	0,1208937	58,67	0,0148979
100	49,88	0,1602066	78,09	0,0198291
	50,03	0,1606884	77,9	0,0197809
	49,87	0,1601745	78,1	0,0198317
125	62,41	0,2004509	97,66	0,0247985
	62,45	0,2005794	97,62	0,0247883
	62,62	0,2011254	97,48	0,0247527
150	75	0,2408880	117,16	0,0297500
	74,82	0,2403099	117,09	0,0297322
	75,12	0,2412734	117,12	0,0297399

[] mg/mL: Concentración teórica del estándar.

Tabla B. Áreas de Respuesta y RSD (Norfloxacino Std.)

POTENCIA (%)	RESPUESTAS	ÁREAS			PROMEDIO	SD	RSD
50	1	1 689,64856	1 691,06055	1 693,02026	1 691,24312	1,69325	0,10012
	2	1 732,89929	1 730,48730	1 731,23682	1 731,54114	1,23446	0,07129
	3	1 685,54199	1 735,01038	1 736,85022	1 719,13420	29,10625	1,69308
75	1	2 617,31396	2 600,53735	2 613,99805	2 610,61645	8,88482	0,34033
	2	2 642,70288	2 616,73560	2 621,25513	2 626,89787	13,87283	0,52811
	3	2 633,63989	2 638,64136	2 646,41113	2 639,56413	6,43543	0,24381
100	1	3 513,40576	3 496,93384	3 507,08813	3 505,80924	8,31010	0,23704
	2	3 551,62915	3 528,69824	3 519,04321	3 533,12353	16,73763	0,47373
	3	3 541,49048	3 557,11938	3 554,76392	3 551,12459	8,42610	0,23728
125	1	4 515,44678	4 536,34766	4 576,32959	4 542,70801	30,93573	0,68100
	2	4 429,10303	4 431,95117	4 379,09863	4 413,38428	29,72637	0,67355
	3	4 334,35937	4 360,65723	4 360,15625	4 351,72428	15,04054	0,34562
150	1	5 347,84814	5 361,24561	5 314,41553	5 341,16976	24,11876	0,45156
	2	5 170,72217	5 181,21680	5 129,85938	5 160,59945	27,13389	0,52579
	3	5 333,75977	5 308,72119	5 350,73438	5 331,07178	21,13518	0,39645

donde: SD : Desviación estándar
RSD : Desviación estándar relativa

Tabla C. Áreas de Respuesta y RSD (Fenazopiridina Clorhidrato Std.)

POTENCIA (%)	RESPUESTAS	ÁREAS			PROMEDIO	SD	RSD
50	1	216,64377	216,33057	217,08064	216,68499	0,37673	0,17386
	2	216,59776	217,65511	217,33295	217,19527	0,54195	0,24952
	3	213,14128	213,73473	213,6026	213,49287	0,31157	0,14594
75	1	325,73111	325,3421	325,21481	325,42934	0,26898	0,08265
	2	325,70847	322,98038	323,89212	324,19366	1,38882	0,42839
	3	324,56119	325,59961	325,55258	325,23779	0,58643	0,18031
100	1	435,75842	432,33652	434,95956	434,35150	1,79015	0,41214
	2	437,3212	434,73434	435,62598	435,89384	1,31407	0,30146
	3	441,54593	441,14352	442,70816	441,79920	0,81249	0,18390
125	1	567,29205	565,68555	569,20752	567,39504	1,76324	0,31076
	2	546,06073	545,67731	544,1886	545,30888	0,98895	0,18136
	3	545,00793	543,28705	543,0979	543,79763	1,05241	0,19353
150	1	663,63251	664,46667	666,26947	664,78955	1,34780	0,20274
	2	648,51593	651,62109	649,69214	649,94305	1,56771	0,24121
	3	661,7157	660,05237	660,64056	660,88404	1,17615	0,17797

donde: SD : Desviación estándar
RSD : Desviación estándar relativa

Tabla D. Variables de Linealidad del Sistema

VARIABLES	NORFLOXACINO STD.	FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO STD.
Varianza del Error Experimental $S_{y,x}$	3 591,87160	41,07639
Varianza de la pendiente "b" S^2_b	74 699,08607	55 639,08888
Desviación Estándar SD_b	273,31134	235,87940
Desviación estándar Relativa RSD_b (%)	1,22427	1,05158
Varianza del término independiente "a" S^2_a	28 923,31443	327,88542
Desviación Estándar SD_a	170,06856	18,10761
Desviación estándar Relativa RSD_a (%)	242,60766	264,55403
Intervalo de confianza de la pendiente "b"	Mín.: 21 734,06175 Máx.: 22 914,76673	Mín.: 21 921,48303 Máx.: 22 940,48200
Intervalo de confianza del término independiente "a"	Mín.: - 437,44833 Máx.: 297,24785	Mín.: - 45,95702 Máx.: 32,26786
Test estadístico de la pendiente "b" (t_{exp})	81,68126	95,09513
Test estadístico del término independiente "a" (t_{exp})	0,41219	0,37800

Anexo 10. Tablas de Linealidad del Método

Tabla A. Equivalencias (Concentración del analito)

POTENCIA (%)	NORFLOXACINO STD.			FENAZOPIRIDINA CLORHIDRATO STD.		
	PESO ST. (mg)	[] mg/mL	PLACEBO (mg)	PESO ST. (mg)	[] mg/ML	PLACEBO (mg)
80	320,16	0,1285378	201,98	40,12	0,015918	201,98
	320,02	0,284816	202,16	40,15	0,0159299	202,16
	320,02	0,1284816	202,08	39,97	0,0158585	202,08
100	400,15	0,1606522	111,92	50,13	0,0198896	111,92
	399,95	0,1605719	112,15	50,04	0,0198539	112,15
	400,09	0,1606281	112,05	50	0,019838	112,05
120	480,17	0,1927787	22,05	60,07	0,0238334	22,05
	479,93	0,1926823	22,16	59,91	0,0237699	22,16
	480,06	0,1927345	22,13	60,07	0,0238334	22,13

[] mg/mL: Concentración teórica del estándar.

Tabla B. Áreas de Respuesta y RSD (Norfloxacino Std.)

POTENCIA (%)	RESPUESTAS	ÁREAS			PROMEDIO	SD	RSD
80	1	2 742,6304	2 745,9248	2 744,3594	2 744,30485	1,64789	0,06005
	2	2 701,7988	2 695,9614	2 693,0378	2 696,93270	4,46052	0,16539
	3	2 720,6235	2 725,6536	2 707,4802	2 717,91911	9,38366	0,34525
100	1	3 435,7642	3 428,1626	3 428,5554	3 430,82739	4,27987	0,12475
	2	3 409,2669	3 407,3767	3 407,2698	3 407,97111	1,12341	0,03296
	3	3 415,5400	3 414,0991	3 415,5735	3 415,07088	0,84174	0,02465
120	1	4 143,3350	4 135,3208	4 135,0908	4 137,91553	4,69478	0,11346
	2	4 103,6826	4 102,0098	4 092,4829	4 099,39177	6,04143	0,14737
	3	4 114,7446	4 119,0640	4 126,3140	4 120,04085	5,84620	0,14190

donde: SD : Desviación estándar
RSD : Desviación estándar relativa

Tabla C. Áreas de Respuesta y RSD (Fenazopiridina Clorhidrato Std.)

POTENCIA (%)	RESPUESTAS	ÁREAS			PROMEDIO	SD	RSD
80	1	343,62438	342,99843	343,58972	343,40418	0,35181	0,10245
	2	342,24380	342,99756	343,12587	342,78908	0,47656	0,13902
	3	340,24589	340,31289	341,89756	340,81878	0,93485	0,27430
100	1	426,54588	427,87564	426,31208	426,91120	0,84337	0,19755
	2	425,42189	425,32015	424,99873	425,24692	0,22088	0,05194
	3	427,43039	429,69064	426,99475	428,03859	1,44720	0,33810
120	1	511,43906	510,72888	512,51175	511,55990	0,89756	0,17545
	2	507,53891	509,41360	508,79465	508,58239	0,95520	0,18782
	3	510,81390	511,49033	509,56641	510,62355	0,97598	0,19114

donde: SD : Desviación estándar
RSD : Desviación estándar relativa

Tabla D. Variables de Linealidad del Método

VARIABLES	NORFLOXACINO STD.	FENADOPIRIDINA CLORHIDRATO STD.
Varianza del Error Experimental $S_{y,x}$	281,99738	1,09866
Varianza de la pendiente "b" S_b^2	45 568,3943	11 705,44466
Desviación Estándar SD_b	213,46755	108,1917
Desviación estándar Relativa RSD_b (%)	0,97977	0,50965
Varianza del término independiente "a" S_a^2	1 206,8918	4,7318
Desviación Estándar SD_a	34,74035	2,17672
Desviación estándar Relativa RSD_a (%)	43,16137	44,6597
Intervalo de confianza de la pendiente "b"	Mín.: 21 282,56928 Máx.: 22 292,27080	Mín.: 20 972,93565 Máx.: 21 484,68239
Intervalo de confianza del término independiente "a"	Mín.: - 162,65038 Máx.: 1,67148	Mín.: - 0,27393 Máx.: 10,02195
Test estadístico de la pendiente "b" (t_{exp})	102,06432	196,21476
Test estadístico del término independiente "a" (t_{exp})	2,31689	2,23916